



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**ESTUDO DA MORTE CELULAR INDUZIDA POR GLUTAMATO E SUA
MODULAÇÃO POR GUANOSINA-5'-MONOFOSFATO EM FATIAS DE
HIPOCAMPO DE RATOS**

Simone Molz

**Orientadora: Dr^a Carla I. Tasca
Departamento de Bioquímica**

Florianópolis, fevereiro de 2003.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**ESTUDO DA MORTE CELULAR INDUZIDA POR GLUTAMATO E SUA
MODULAÇÃO POR GUANOSINA-5'-MONOFOSFATO EM FATIAS DE
HIPOCAMPO DE RATOS**

Simone Molz

Orientadora: Dr^a Carla I. Tasca
Departamento de Bioquímica

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção de grau de
Mestre.**

Florianópolis, fevereiro de 2003.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus e aos meus pais, Valdir e Maria Helena, pela compreensão, incentivo e apoio em todas as decisões que tomei em minha vida.

Agradeço à minha orientadora Dra^a. Carla I. Tasca, pelos ensinamentos científicos que me foram passados durante toda a iniciação científica e também no desenvolvimento deste trabalho. Além disso, também agradeço sua amizade e compreensão, que a tornaram uma amiga.

Agradeço também ao Dr. Rodrigo Bairy Leal, pois foi através da colaboração com seu laboratório, que conseguimos realizar uma parte importante deste estudo.

Ao querido Paulo, pelo carinho, compreensão e apoio nas horas mais difíceis.

Ao Fabiano Mendes de Córdova, pela amizade e ensinamentos da técnica de “Western Blot”.

À toda galera do laboratório: Tiago, Sheila, Helena, Carla, Dani, Karina, Rossana, Karine, Cláudia, Guilherme, Patrícia, Priscila, Talise, Manuel e Maurício, pela grande amizade, convivência e companheirismo.

Agradeço especialmente às alunas Helena Decker e Carla Cremonez, pela amizade e contribuição para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Nelson Gabilán, pelo auxílio técnico e amizade.

Ao professor Dr. Hernán Terenzi e Dr. Boris Stanbuk, pelo empréstimo de materiais e equipamentos e amizade.

Aos professores da Pós Graduação em Neurociências.

Ao Nivaldo, secretário da Pós Graduação em Neurociências, pela disponibilidade e dedicação aos alunos.

À CAPES, pelo financiamento da bolsa de estudo, e ao FUNPESQUISA – UFSC e ao CNPq, pelos auxílios financeiros.

Ao Biotério Central da UFSC, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1- TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA.....	1
1.2- GLUTAMATO E EXCITOTOXICIDADE.....	5
1.3- MORTE CELULAR: NECROSE OU APOPTOSE.....	6
1.3.1- Morte celular e Excitotoxicidade.....	9
1.3.2- Vias de sinalização celular envolvidas na morte e sobrevida celular.....	10
1.4- PURINAS.....	11
1.4.1- Derivados da Guanina e Excitotoxicidade.....	13
1.5- Objetivo Geral.....	16
1.5.1-Objetivos Específicos.....	16
2- METODOLOGIA.....	17
2.1- MATERIAIS.....	17
2.2- EQUIPAMENTOS.....	18
2.3- ANIMAIS.....	18
2.4- PREPARAÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAS.....	19
2.5- EXPOSIÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAS AO INSULTO GLUTAMATÉRGICO.....	19
2.6- AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	20

2.7- AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE LDH.....	20
2.8- SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE (SDS-PAGE).....	21
2.8.1- Avaliação da via das MAPK.....	21
2.8.2- Avaliação da liberação do citocromo c.....	22
2.9- ELETROFORESE E IMUNODETECÇÃO (WESTERN BLOT).....	23
2.10- ANÁLISE DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA.....	24
2.11- DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	25
2.12- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
3- RESULTADOS.....	26
3.1- PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE INJÚRIA CELULAR INDUZIDA POR GLUTAMATO EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS.....	26
3.1.1- Determinação da viabilidade celular de fatias de hipocampo submetidas a diferentes tempos de incubação.....	26
3.1.2- Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a diferentes tempos de incubação e concentrações de glutamato	30
3.2- AVALIAÇÃO DO PAPEL DO GMP NA TOXICIDADE CELULAR INDUZIDA POR GLUTAMATO E NMDA EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS	39
3.3- AVALIAÇÃO DO SUBTIPO DE RECEPTOR GLUTAMATÉRGICO ENVOLVIDO NO DANO CELULAR INDUZIDO POR GLUTAMATO EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS.....	43
3.3.1- Envolvimento de receptores ionotrópicos.....	43
3.3.2- Envolvimento de receptores metabotrópicos.....	45

3.4- AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA INDUZIDA POR GLUTAMATO E GMP EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS.....	47
3.5- AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DO CITOCROMO C INDUZIDA POR GLUTAMATO EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS.....	51
3.6- DETERMINAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DE MAPKS POR GLUTAMATO E GMP.....	52
3.6.1- Análise da fosforilação de ERK 1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens incubadas com glutamato e GMP.....	52
3.6.2- Análise da fosforilação da p38 ^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens incubadas com glutamato e GMP.....	54
4- DISCUSSÃO.....	56
5-CONCLUSÕES.....	65
6-PERSPECTIVAS.....	67
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da ativação da via intrínseca na morte celular apoptótica8
Figura 2 - Avaliação da concentração de proteínas em fatias de hipocampo de ratos incubadas em meio fisiológico e submetidas a diferentes períodos de incubação	27
Figura 3 - Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos incubadas em meio fisiológico e submetidas a diferentes períodos de incubação	28
Figura 4 - Avaliação da liberação de LDH em fatias de hipocampo de ratos incubadas em meio fisiológico e submetidas a diferentes períodos de incubação	29
Figura 5 - Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos incubadas por 1, 3, ou 6 horas na presença de diferentes concentrações de glutamato	31
Figura 6 - Avaliação da liberação da LDH em fatias de hipocampo de ratos incubadas por 1, 3, ou 6 horas na presença de diferentes concentrações de glutamato	32
Figura 7 - Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos incubadas por 6 horas na presença de glutamato, NMDA e H ₂ O ₂	34
Figura 8 - Avaliação da liberação de LDH em fatias de hipocampo de ratos incubadas por 6 horas na presença de glutamato, NMDA e H ₂ O ₂	35

Figura 9 - Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos incubadas por 1 hora com glutamato, NMDA, H ₂ O ₂ e staurosporina e submetidas a 6 horas adicionais de incubação em meio de cultura	37
Figura 10 - Avaliação da liberação de LDH em fatias de hipocampo de ratos incubadas por 1 hora com glutamato, NMDA, H ₂ O ₂ e staurosporina e submetidas a 6 horas adicionais de incubação em meio de cultura	38
Figura 11 - Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos tratadas com glutamato na presença ou ausência de GMP	40
Figura 12 - Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos tratadas com glutamato e GMP 5mM	41
Figura 13 - Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos tratadas com NMDA e GMP	42
Figura 14 - Efeito de antagonistas ionotrópicos sobre a viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos tratadas com glutamato	44
Figura 15 - Efeito do M-CPG sobre a viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos tratadas com glutamato	46

Figura 16 - Análise da fragmentação internucleossomal do DNA em fatias de hipocampo tratadas com glutamato e GMP	49
Figura 17 - Análise da fragmentação internucleossomal do DNA em fatias de hipocampo tratadas com glutamato e GMP	50
Figura 18 - Immunoblotting” representativo da liberação do citocromo c induzida por glutamato.	51
Figura 19 - Avaliação da fosforilação da ERK 1/2 em fatias de hipocampo tratadas com glutamato e GMP 1mM	53
Figura 20 - Avaliação da fosforilação da p38 ^{MAPK} em fatias de hipocampo tratadas com glutamato e GMP 1mM	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ADO: adenosina

ADP: adenosina-5'-difosfato

AMP: adenosina-5'-monofosfato

AMPA: alfa-amino-3-hidróxi-metil-isoxazole

AP7: ácidoD-2-amino-7-fosfonoheptanóico

APAF-1: proteína ativadora da apoptose-1

ATP: adenosina-5'-trifosfato

Bax, Bad, Bim, Bid, Bik: proteínas pró-apoptóticas da família das Bcl-2

Bcl-2: "B cell linfoma-2"

CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona

CPP: ácido [3-[(±)-carboxipiperazina-4-il]prop-1-il]-fosfônico

Cyto c: citocromo c

d-ATP: desoxi-adenosina-5'-trifosfato

DG: derivados da guanina

DMEM: meio de Eagle modificado por Dubelcco

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desóxirribunocleico

DNases: endonucleases que clivam DNA

DNQX: 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona

ECL: quimioluminescência

EDTA: ácido etileno dinitrilo tetra acético

ERK: quinase regulada por sinal extracelular

GAMS: γ -D-glutamilamino-metilsulfonato

GDP: guanosina-5'-difosfato

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

Glu: glutamato

GMP: guanosina-5'-monofosfato

GTP: guanosina-5'-trifosfato

GUO: guanosina

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HEPES: ácido hidroxietil piperazina etanosulfônico

JNK: quinase-c-Jun-NH₂-terminal

KA: kainato

KRB: tampão Krebs-Ringer-Bicarbonato

LDH: lactato desidrogenase

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

M-CPG: (+)- α -metil-4-carboxifenilglicina

MK-801: +-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d]ciclohepteno-5,10-imina

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NBQX: 2,3-dihidróxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo-(F)-quinoxalina

NMDA. N-metil-D-aspartato

p38^{MAPK}: proteína quinase de 38 KDa ativada por mitógeno

PLD: Fosfolipase D

RNAse: enzima que degrada RNA

SDS: duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SNC: sistema nervoso central

TBS: tampão tris-salina

TBS-T: tampão tris-salina com Tween-20

TEMED: N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina

TNF: fator de necrose tumoral

Tris: Tris hidroxil metil amino metano

RESUMO

O aminoácido glutamato é o neurotransmissor excitatório mais importante do sistema nervoso de mamíferos e a ativação de seus receptores tem importante papel em processos fisiológicos e patológicos. A morte celular excitotóxica pode ser tanto necrótica quanto apoptótica e envolve a ativação de diversas vias de sinalização celular, como as quinases ativadas por mitógenos, ERK 1/2 e p38^{MAPK}. Na necrose, ocorre ruptura da membrana plasmática e depleção dos níveis de ATP. Na apoptose, as organelas permanecem intactas e a carga energética é mantida. A cromatina condensa-se e o DNA é fragmentado em frações internucleossomais. Os nucleotídeos e nucleosídeos derivados da guanina (DG) podem modular a transmissão glutamatérgica, promovendo neuroproteção. O objetivo deste estudo foi avaliar o tipo de morte celular induzida por glutamato em fatias de hipocampo de ratos e o possível papel neuroprotetor do GMP. Glutamato 10 μ M não promoveu alterações na viabilidade celular, na liberação de LDH e também não induziu liberação do citocromo c da mitocôndria e modulação das vias das ERK 1/2 e p38^{MAPK}, porém, promoveu fragmentação de DNA em frações internucleossomais. Glutamato 1 e 10 mM promoveram redução significativa da viabilidade celular sem alteração na liberação de LDH e induziram a liberação do citocromo c e fragmentação do DNA, sugerindo morte celular por apoptose. Glutamato 1 e 10 mM promoveram inibição das vias da ERK 2 e p38^{MAPK}. A redução de viabilidade celular induzida por glutamato 1 mM e 10 mM, é bloqueada por antagonistas ionotrópicos (MK-801 e GAMS), e antagonistas ionotrópicos e metabotrópicos (MK-801, GAMS e M-CPG), respectivamente. GMP 1 mM não alterou a redução de viabilidade celular e a inibição da ERK 2 e p38^{MAPK}, induzidas por glutamato. Contudo, GMP protegeu contra a redução de viabilidade celular induzida por NMDA, sugerindo que a alteração de

viabilidade induzida por glutamato pode envolver outros mecanismos além da ativação de seus receptores. GMP *per se* induziu e também aumentou o grau de fragmentação de DNA promovido por glutamato. O aumento da concentração de GMP de 1 para 5 mM reduziu a viabilidade celular. Estes resultados demonstram que glutamato (1 e 10 mM) induz morte celular por apoptose e apontam o GMP como um potencial agente indutor de apoptose em fatias de hipocampo de ratos.

ABSTRACT

The amino acid glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system and activation of its receptors displays important roles in physiological and pathological processes. Excitotoxic cell death may be either necrotic or apoptotic and involves the activation of several cellular signalling pathways, as the mitogen activated kinases, ERK 1/2 and p38^{MAPK}. Necrosis causes rupture of the plasmatic membrane and ATP levels depletion. During apoptosis, cellular organelles remain intact and energetic charge is maintained. The chromatin is condensed and DNA is fragmented in internucleosomal fractions. Guanine nucleotides and nucleosides may modulate glutamatergic transmission, therefore affording neuroprotection. The purpose of this study was to evaluate the cellular death induced by glutamate in hippocampal brain slices and the possible neuroprotective role of GMP. Glutamate 10 μ M did not alter cell viability and LDH leakage from slices. It also did not induced cytochrome c release from mitochondria or ERK 1/2 and p38^{MAPK} modulation. Although, it induced internucleosomal DNA fragmentation. Glutamate 1 and 10 mM promoted a significant reduction in cell viability without alterations in LDH leakage. They also induced cytochrome c release and DNA fragmentation, suggesting an apoptotic mode of cell death. Glutamate 1 e 10 mM promoted ERK 2 e p38^{MAPK} pathways inhibition. The reduction in cell viability induced by glutamate 1 mM and 10 mM is blocked by ionotropic (MK-801, GAMS) and ionotropic and metabotropic glutamate antagonists (MK-801, GAMS and M-CPG), respectively. GMP 1 mM did not alter the reduction in cell viability and the ERK 2 and p38^{MAPK} inhibition induced by glutamate. However, GMP had a protective effect against the reduction in cell viability induced by NMDA, suggesting that glutamate-induced alteration in cell viability may involve other mechanisms than its receptors activation. GMP *per se* induced and also enhanced the degree of

DNA fragmentation induced by glutamate. Cell viability was reduced when GMP concentration was increased from 1 mM to 5 mM. These results suggest that glutamate (1 and 10 mM) induce cell death by apoptosis and point to GMP as a potential apoptotic inductor in hippocampal brain slices.

1-INTRODUÇÃO

1.1-TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA

A comunicação celular no sistema nervoso central (SNC) ocorre em zonas de contato especializadas chamadas sinapses. Nesta região, os neurônios pré e pós-sinápticos comunicam-se quando ocorre alteração no potencial elétrico no terminal pré sináptico e a consequente liberação de neurotransmissores.

Ao interagir com receptores de membrana, os neurotransmissores abrem ou fecham canais iônicos, ativam ou inibem sistemas enzimáticos. O processo é finalizado com a captação ou metabolização destes neurotransmissores e/ou modificação do número ou atividade dos receptores (KANDEL et al., 1991; COOPER et al., 1996).

Glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos. Desempenha importante papel na manutenção de aspectos funcionais do cérebro, tais como: cognição, aprendizagem, memória e controle motor (FONNUM, 1984; OTTERSEN & STORM-MATHISEN, 1984; COLLINGRIDGE & LESTER, 1989; HEADLEY & GRILLNER, 1990). Além disto, desempenha papel fundamental no desenvolvimento do SNC, inclusive na indução sináptica, migração, diferenciação e morte celular (McDONALD & JOHNSTON, 1990; KOMURO & RAKIC, 1993; ROSSI & SLATER, 1993; JOHNSTON, 1995; LaMANTIA, 1995; VALLANO, 1998; DANBOLT, 2001).

O metabolismo celular do glutamato envolve tanto neurônios quanto astrócitos. Glutamato é transportado para o interior de vesículas sinápticas por um carreador de baixa afinidade através de um mecanismo dependente de gradiente próton-eletroquímico promovido

por uma ATPase (NAITO & UEDA, 1985) e subsequentemente liberado por exocitose. Quando o glutamato é liberado das vesículas sinápticas após um estímulo de despolarização promovido pela entrada de íons cálcio, ele interage com seus receptores específicos localizados principalmente na membrana dos terminais pós-sinápticos e de astrócitos.

Como parece não haver nenhuma enzima extracelular capaz de metabolizar o glutamato liberado pelos terminais pré-sinápticos, a única maneira rápida e eficaz de promover a sua retirada do fluido extracelular é através da recaptação feita por carreadores de alta afinidade para o glutamato. Estes carreadores estão localizados nos neurônios e principalmente nas células gliais e são dependentes de íons sódio (ROBINSON & DOWD, 1997). Uma eficiente captação de glutamato, suplementada por um processo de difusão passiva para fora da fenda sináptica (ISAACSON & NICOLL, 1993), contribuem para o término das ações do glutamato em seus receptores sinápticos.

Nos astrócitos, o glutamato recaptado do fluido extracelular é convertido à glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase e liberado por intermédio de transportadores de glutamina para o meio extracelular. A glutamina liberada pelos astrócitos é captada pela células neuronais e reconvertida a glutamato. O tráfego de glutamato e glutamina entre neurônios e astrócitos parece ser a maior rota de reciclagem do neurotransmissor glutamato no SNC (DANBOLT, 2001).

O neurotransmissor glutamato pode se unir a uma grande variedade de receptores, os quais são denominados ionotrópicos e metabotrópicos (GASIC & HOLLMAN, 1994). Os receptores ionotrópicos são uma família de canais iônicos caracterizados de acordo com seu agonista mais seletivo: N-metil-D-aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato (AMPA) e kainato (KA). Os receptores metabotrópicos acoplam-se a proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina (proteínas-G), através das quais promovem a modulação de

efetores intracelulares e ativam e/ou inibem diversos eventos de transdução do sinal celular (OBRENOVITCH & URENJAK, 1997).

Os diferentes subtipos de receptores ionotrópicos apresentam algumas diferenças quanto as suas propriedades farmacológicas e fisiológicas.

Os receptores AMPA e KA são permeáveis a Na^+ e K^+ e são responsáveis pela rápida ativação da neurotransmissão excitatória no SNC (BLEAKMAN & LODGE, 1998; SEGOVIA et al., 2001). O receptor do subtipo NMDA ativa canais de Na^+ , K^+ , é altamente permeável a Ca^{2+} , dependente de voltagem e altamente regulado (SEGOVIA et al., 2001). O receptor NMDA apresenta três aspectos característicos: (i) sob condições de repouso permanece bloqueado por Mg^{2+} . Correntes iônicas através deste receptor ocorrem somente quando a membrana neuronal é despolarizada; (ii) quantidades significativas de íons Ca^{2+} entram na célula durante a ativação deste receptor; e (iii) a neurotransmissão mediada pelo receptor NMDA ocorre lentamente e continua por um período prolongado (OZAWA, et al., 1997). Os receptores NMDA são positivamente regulados por glicina, poliaminas e por fosforilação. A sua atividade pode ser diminuída pela oxidação de grupos sulfidril em seu sítio redox (STONE & ADDAE, 2002).

Efeitos neurotóxicos dos agonistas dos receptores glutamatérgicos e o bloqueio ou prevenção da indução de toxicidade na presença de antagonistas específicos têm sido avaliados. Entre os compostos mais freqüentemente usados estão os antagonistas dos receptores NMDA, tais como: ácido [3-[(\pm)-carboxipiperazina-4-il]prop-1-il]-fosfônico (CPP), ácido D-2-amino-7-fosfonoheptanóico (AP7) e (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d]ciclohepteno-5,10-imina (MK-801); e os antagonistas não NMDA, 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX), γ -D-glutamilamino-metilsulfonato (GAMS), e 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), são

mais efetivos para os receptores de KA; e 2,3-dihidróxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo-(F)-quinoxalinal (NBQX) é o mais efetivo antagonista competitivo específico para os receptores AMPA (SHEARDOWN et al., 1990).

Estudos de clonagem e expressão gênica têm levado à identificação das subunidades dos receptores ionotrópicos, assim distribuídos: cinco subunidades para receptores NMDA (NR1, NR2A, NR2B, NR2C e NR2D), quatro para receptores AMPA (GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4) e cinco para receptores KA (GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e KA2).

Os oito subtipos de receptores metabotrópicos são classificados em três subgrupos, com base nas seqüências homólogas de seus aminoácidos. São eles: grupo I (mGluR1 e mGluR5), grupo II (mGluR2 e mGluR3), grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) (PIN & DUVOISIN, 1995).

Os receptores do grupo I são potencialmente ativados por quisqualato e 1S,3R-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato (1S,3R-ACPD) e estão relacionados com a hidrólise de fosfolipídios de membrana; os receptores do grupo II são ativados por 1S,3R-ACPD e os do grupo III por L-2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP4), ambos modulam a atividade da adenilato ciclase (DUVOISIN et al., 1995). Estudos recentes têm mostrado que 1S,3R-ACPD também estimula atividade da fosfolipase D (PLD) em fatias de hipocampo de ratos neonatos e adultos, e que a resposta produzida por ele é consideravelmente mais acentuada em animais recém-nascidos do que em adultos. Estes achados indicam que outros mecanismos de transdução de sinal, além daqueles ativados por fosfolipase C e adenilato ciclase podem estar operantes após a estimulação de mGluRs (PELLICCIARI & COSTANTINO, 1999).

1.2-GLUTAMATO E EXCITOTOXICIDADE

A potencialidade do neurotransmissor glutamato como mediador de eventos patológicos foi descoberta simultaneamente à caracterização do seu papel como o principal neurotransmissor excitatório das sinapses no SNC. Estudos realizados paralelamente aos que definiram o papel fisiológico do glutamato no SNC, mostraram que a aplicação direta de altas concentrações de glutamato a neurônios de retina (LUCAS & NEWHOUSE, 1957) e a injeção de glutamato monossódico em camundongos neonatos, produziam lesões hipotalâmicas e retinianas (OLNEY, 1969). O termo excitotoxicidade foi criado para definir a morte neuronal causada pela administração exógena de altas concentrações de glutamato ou compostos com ação agonística nos receptores para glutamato (OLNEY, 1981). Este tipo de excitotoxicidade exógena tem sido amplamente demonstrado *in vitro* e *in vivo*, inclusive em humanos que acidentalmente consomem melhores contaminados com o análogo de KA, o ácido domóico (PENG et al., 1994).

Além de causar toxicidade para neurônios, o excesso de glutamato também pode estar envolvido na morte de células gliais. Glutamato pode induzir morte celular em astrócitos neocorticais (DAVID, 2000) e em oligodendrócitos (MATUTE, 2002). A microglia parece ser o tipo celular menos susceptível à excitotoxicidade. Isto é devido ao fato de que estas células só expressam receptores para glutamato quando estão ativadas (MATUTE, 1997).

A excitotoxicidade glutamatérgica está envolvida em alterações neurológicas agudas como hipóxia, isquemia, traumatismo craniano e epilepsia (MELDRUM, 2000) e em doenças neurodegenerativas crônicas como Alzheimer, Parkinson, Huntington (LIPTON & ROSENBERG, 1994). O mecanismo primário da morte celular induzida por glutamato envolve o desequilíbrio iônico promovido pela entrada excessiva de cálcio, inicialmente por atuar via seus receptores ionotrópicos (KA, AMPA e NMDA) e posteriormente atuando também via seus

receptores metabotrópicos (MICHAELIS, 1998). O aumento de cálcio intracelular leva à ativação de enzimas como proteases, fosfolipases, óxido nítrico sintases e endonucleases que contribuem para a morte celular através de diversos mecanismos (MELDRUM, 2000).

1.3-MORTE CELULAR: NECROSE OU APOPTOSE

Em 1972, KERR e colaboradores introduziram o termo apoptose para diferenciar a morte celular que ocorre durante o desenvolvimento e renovação celular daquela que ocorre em condições patológicas (necrose), causada geralmente por trauma, isquemia ou dano celular. Contudo, foi a partir de 1990, que através de técnicas de biologia molecular pode-se demonstrar os mecanismos envolvidos na morte celular por apoptose (JACOBSON, 1997; KUAN et al., 2000; OLSON & KORNBLUTH, 2001).

Nos últimos anos, vários estudos têm apontado o papel da apoptose no SNC (OCHU et al., 1998; SASTRY & RAO, 2000) e a possibilidade deste processo ser relevante em doenças neurodegenerativas (MATTSON, 2000).

Na morte celular por apoptose, não são observadas alterações de permeabilidade celular, as organelas permanecem geralmente intactas e a carga energética da célula é mantida. A apoptose requer a síntese de novas moléculas e a cromatina torna-se condensada formando grânulos nucleares e o DNA é fragmentado em frações internucleossomais. Geralmente, a apoptose envolve a ativação de caspases, proteases dependentes de cisteína que reconhecem sítios específicos ricos em aspartato em suas proteínas alvo (SASTRY & RAO, 2000) (Fig. 1).

A apoptose pode ocorrer através da ativação de uma via que envolve a participação da mitocôndria (via intrínseca). Nesta via, pode-se observar a translocação de proteínas pró-

apoptóticas da família das Bcl-2 (Bax e Bad) do citosol para a mitocôndria com a consequente formação de poros na membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol. O citocromo c presente no citosol liga-se à Apaf-1 (proteína reguladora da apoptose) e em seguida à pró-caspase-9. Este complexo é chamado de apoptossoma e promove a ativação da pró-caspase-9 através de uma reação que requer hidrólise do ATP. Subsequentemente, a caspase 9 leva à ativação de caspases efetoras, como a caspase-3 (OLSON & KORNBLUTH, 2001). A ativação de uma cascata de caspases pode então ativar DNAses que são responsáveis pela clivagem do DNA em fragmentos internucleossomais (NAGATA, 2000) (Fig. 1). A apoptose pode também ocorrer através da ativação de uma via extrínseca, a qual se desenvolve de maneira independente da formação do apoptossoma. A ligação de moléculas como Fas e fator de necrose tumoral (TNF) à seus receptores de superfície pode ativar a via extrínseca, com o recrutamento de moléculas adaptadoras e a ativação direta da caspase-8. Uma vez ativada, a caspase-8 pode processar e ativar outras caspases levando à destruição celular (OLSON & KORNBLUTH, 2001).

Ao contrário do que é observado durante a apoptose, a morte celular necrótica envolve desbalanço na homeostasia da célula, o que leva ao inchaço de compartimentos celulares como a mitocôndria e outras organelas. Estes eventos contribuem para que haja ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo intracelular. Durante este processo, geralmente ocorre depleção da carga energética da célula (ATP) e o mesmo não é dependente da síntese de novas moléculas (SASTRY E RAO, 2000).

Apesar de estarem descritos parâmetros específicos que permitem diferenciar estes dois tipos de morte celular, alguns destes podem ser encontrados tanto na apoptose quanto na necrose. Por exemplo, THOMAS & MAYLE (2000), demonstraram rompimento da membrana celular (evento geralmente necrótico) com a administração de um indutor clássico de apoptose (staurosporina) em cultura de neurônios corticais. Também foi verificado que características

morfológicas encontradas na morte celular por apoptose nem sempre estão associadas à fragmentação do DNA (FALCIERI, 1993; FUKUDA et al., 1993).

Ativação via intrínseca

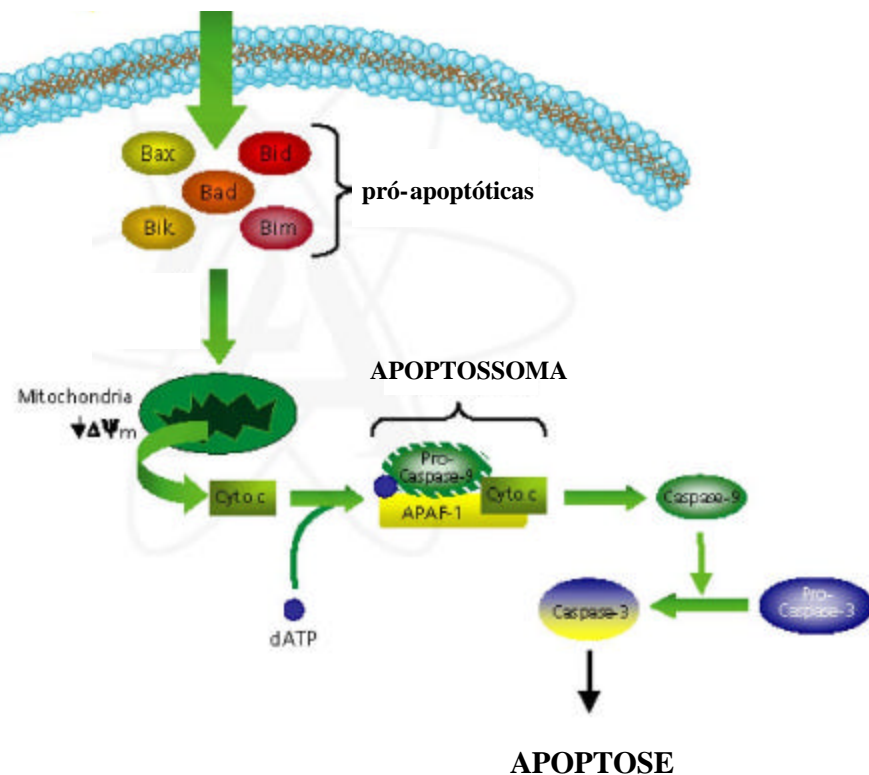


Figura 1: Esquema representativo da ativação da via intrínseca na morte celular apoptótica.

A ativação de proteínas pró-apoptóticas da família da Bcl-2 induzem a formação de poros na membrana mitocondrial e liberação do citocromo c. O citocromo c liberado interage com a APAF-1 e com a pró-caspase-9, em uma reação que requer a hidrólise do d-ATP, formando o apoptossoma. O apoptossoma ativa a caspase-9, que por sua vez ativa a caspase-3 levando à morte de células por apoptose. Bax, Bad, Bik, Bim e Bid = proteínas pró-apoptóticas da família das Bcl-2; $\Delta\Psi_m$ = potencial de membrana mitocondrial; cyto c = citocromo c; APAF-1 = fator ativador da apoptose-1; d-ATP = desoxi-adenosina-5'-trifosfato.

1.3.1-MORTE CELULAR E EXCITOTOXICIDADE

A morte celular excitotóxica pode ser tanto necrótica quanto apoptótica. Em culturas de neurônios corticais, demonstrou-se que a exposição ao glutamato pode causar necrose e apoptose dependendo da função mitocondrial (ANKARCRONA et al., 1995; ANKARCRONA, 1998) e outro estudo utilizando retina de pinto observou morte celular por apoptose seguida de necrose (IENTILE et al., 2001). Modelos de isquemia *in vivo* demonstraram a ocorrência de necrose na zona isquêmica (local onde o acúmulo de glutamato causa dano celular), enquanto que na região de penumbra as células inicialmente sobrevivem para posteriormente morrerem por apoptose (IRVING et al., 2000).

Vários outros trabalhos utilizando diferentes modelos demonstram o envolvimento da ativação de receptores glutamatérgicos e a indução de morte celular por apoptose com liberação de citocromo c, ativação de caspases e fragmentação de DNA (HIRASHIMA et al., 1999; THOMAS E MAYLE, 2001; CHEN, et al., 2001; HIRAI et al., 2002).

Em estudos realizados em nosso laboratório, observamos indução de morte celular em fatias de hipocampo de ratos utilizando um modelo de isquemia química (MOLZ et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002). Neste modelo, foi observada redução da viabilidade celular com liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) para o meio extracelular e diminuição dos níveis de ATP, parâmetros que sugerem uma morte celular necrótica.

A utilização de fatias de hipocampo de ratos para avaliação de toxicidade apresenta algumas vantagens em relação a outros modelos *in vitro* pelo fato de manter a citoarquitetura do tecido de origem e a manutenção da matriz extracelular, preservando assim as interações neurônio-glia (GÄHWILER et al., 1997). Por outro lado, as fatias são estruturas que mantêm-se

viáveis por pouco tempo, e por isso alternativas devem ser estabelecidas para estudos que necessitem a manutenção destas preparações por períodos de tempo mais prolongados.

1.3.2- VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA MORTE E SOBREVIVÊNCIA CELULAR

Dano físico, isquemia ou a liberação não apropriada de neurotransmissores são geralmente acompanhados por eventos como o influxo de cálcio e o início de uma cascata de eventos que levam à ativação de várias vias de sinalização celular que estão associadas à neurodegeneração. Por outro lado, os insultos também podem acarretar a ativação de vias que culminam na produção e ativação de fatores que estão envolvidos na recuperação celular (SAPOLSKY, 2001; BUTLER et al., 2002).

Respostas a vários estímulos celulares são mediadas pela cascata das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (MUKHERJEE et al, 1999, CHANG & KARIN, 2001, CROSSTHWAITE et al., 2002, LEAL et al., 2002,). Estas proteínas são serina/treonina quinases que podem ser diferenciadas das proteínas tirosina quinases pelo fato da sua ativação requerer a dupla fosforilação em resíduos distintos de treonina e tirosina. As três principais MAPKs identificadas são as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) e as proteínas quinases ativadas por estresse, as quinases c-Jun NH₂-terminal (JNK) e as p38^{MAPK}.

Geralmente, as ERK1/2 são principalmente ativadas por fatores de crescimento e estão envolvidas na proliferação, diferenciação e sobrevivência da célula, enquanto que a ativação da JNK e p38^{MAPK} está ligada à morte celular (BONNI et al., 1999; HARPER & LOGRASSO, 2001; CHANG & KARIN, 2001). Além do seu papel na mitogênese, as ERK1/2 participam de

processos de indução de potenciação de longa duração e formação de memória dependente de hipocampo (SWEATT, 2001).

No que se refere modulação das MAPK por glutamato, a maioria dos trabalhos utilizando culturas de células demonstram o aumento da fosforilação e ativação das ERK1/2 (JIANG et al., 2000; PERKINTON et al., 2002; JIN et al., 2002). Kawasaki e colaboradores (1997) demonstraram a ativação da p38^{MAPK} em neurônios granulares tratados com glutamato e recentes evidências tem demonstrado o envolvimento da ativação da ERK 1/2 e a indução de apoptose (Jiang et al., 2000).

1.4-PURINAS

As purinas, representadas pela adenina e guanina, seus nucleosídeos correspondentes, adenosina (ADO) e guanosina (GUO), seus produtos metabólicos, nucleosídeo inosina e as bases hipoxantina e xantina, bem como os nucleotídeos das purinas, adenosina-5'-trifosfato (ATP), adenosina-5'-difosfato (ADP), adenosina-5'-monofosfato (AMP), guanosina-5'-trifosfato (GTP), guanosina-5'-difosfato (GDP) e guanosina-5'-monofosfato (GMP), são moléculas onipresentes em células animais e vegetais (RATHBONE, et al., 1999).

O ATP é considerado a molécula de energia celular universal e também outros nucleotídeos e nucleosídeos estão envolvidos nas vias bioquímicas e na transferência de energia dentro da célula. Nucleotídeos cíclicos como AMP cíclico e GMP cíclico agem como importantes segundos-mensageiros intracelulares durante a transdução de sinal.

As funções intracelulares dos nucleotídeos da guanina tem sido bem caracterizadas, como por exemplo, servindo como fonte de energia para a síntese protéica nos ribossomas,

controle do movimento vesicular nas células, e são responsáveis pelo ciclo de ativação/inativação das proteínas-G monoméricas e heterotriméricas (BOURNE et al., 1990; HEPLER & GILMAN, 1992; EXTON, 1998). GDP une-se às proteínas-G em seu estado inativo; GTP participa da ativação das proteínas-G, e não foi demonstrada até então nenhuma interação de GMP ou do nucleosídeo GUO com as proteínas-G.

Além do seu papel no metabolismo e sinalização celular, ATP e adenosina funcionam como neurotransmissores e neuromoduladores através da sua interação com receptores de membrana específicos, denominados P_2 (P_{2x} e P_{2y}) e P_1 (A_1 , A_{2a} , A_{2b} , A_3), respectivamente (BURNSTOCK, 1997). Os derivados da adenina são importantes mensageiros intercelulares, podendo afetar a função cardíaca, agregação plaquetária e o tônus vascular (HUTTERMANN et al., 1984; OLSSON & PEARSON, 1990; BURNSTOCK et al., 1991).

As purinas, através de ação extracelular, apresentam efeitos tróficos tanto em células gliais (astrócitos), promovendo proliferação e diferenciação celular, quanto em neurônios, promovendo a expansão e crescimento de neuritos. Verificou-se também que estes compostos podem exercer seus efeitos tróficos indiretamente através do aumento na produção de fatores de crescimento em culturas de astrócitos (CICCARELLI et al., 2001).

Em relação aos nucleotídeos e nucleosídeo da adenina, tem sido demonstrado envolvimento tanto em situações de toxicidade, quanto em neuroproteção. Foi demonstrado que ADO apresenta efeito neuroprotetor contra insultos isquêmicos (RUDOLPHI et al., 1992; SCHUBERT et al., 1994). Além disso, a liberação de ADO está aumentada em condições isquêmicas/hipóxicas (PEDATA et al., 1993; PHILLIS et al., 1996). A ADO é também considerada um anticonvulsivante endógeno, atuando em seus receptores A_1 , diminuindo a liberação de glutamato. Por outro lado, já foi observado que em células astrogliais, ADO pode induzir morte celular por apoptose (ABRACCHIO et al. 1995; ABRACCHIO et al., 1998).

Os astrócitos são a principal fonte de purinas no SNC. Em condições fisiológicas, os astrócitos podem liberar tanto os derivados da adenina (ADO e ATP) quanto os derivados da guanina (GUO e GTP). Sob condições de hipóxia/isquemia, as células astrocitárias podem liberar até três vezes mais GUO que em condições normais, e a concentração desta purina pode permanecer elevada por até 30 minutos (CICCARELLI et al, 1999). A GUO por sua vez, estimula a liberação de ADO em astrócitos e dessa maneira, pode ser responsável por alguns efeitos da GUO (CICCARELLI et al., 2000). Porém, muitos efeitos da GUO não são bloqueados na presença de antagonistas de adenosina em células PC12 (GYSBERS & RATHBONE, 1992).

Apesar de os efeitos biológicos dos derivados da guanina estarem bem estabelecidos, os receptores para estes compostos ainda não estão bem identificados e caracterizados. Entretanto, observou-se que GTP une-se a sítios específicos que não apresentam atividade enzimática (GTPásica) (TASCA et al., 1999a) e dados recentes sugerem a possível existência de sítios de ligação para GTP em células PC12 (GYSBERS et al., 2000) e para a GUO em preparações de cérebro de ratos (TRAVERSA et al., 2002).

1.4.1- DERIVADOS DA GUANINA E SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

Diversas evidências demonstram que outra importante função extracelular dos derivados da guanina (DG) é a modulação da transmissão glutamatérgica. Os DG podem inibir a união de glutamato e agonistas ionotrópicos (KA, NMDA, AMPA) a seus receptores, sem interagirem com as proteínas-G (SOUZA & RAMÍREZ, 1991; PAZ et al., 1994; PAAS et al., 1996; DEV et al., 1996, TASCA et al., 1999b). Utilizando-se fatias de hipocampo de ratos, foi observado que os DG inibem a fosforilação da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (TASCA et

al., 1995) e o acúmulo de AMP cíclico induzido por glutamato e análogos metabotrópicos (TASCA et al., 1998). Também observou-se que os DG potencializam respostas induzidas por adenosina (TASCA et al., 1999b; TASCA et al., 2000). Além disto, os DG protegem contra o dano induzido por glutamato em fatias de hipocampo de ratos adultos submetidas à hipóxia (REGNER, et al., 1998). Desta maneira, demonstrou-se que não somente a união de glutamato é modulada por DG, mas também respostas celulares induzidas por glutamato podem ser moduladas pelos DG, quando agindo extracelularmente.

GUO estimula a recaptação de glutamato em cultura de astrócitos corticais (FRIZZO et al., 2001). Este efeito não é revertido pela administração de um inibidor do transporte de nucleosídeo ou por antagonistas de receptores de ADO, sugerindo um sítio de ação extracelular sem o envolvimento de receptores de ADO.

Estudos *in vivo* têm demonstrado que GMP reverte o efeito de glutamato em respostas comportamentais como a esQUIVA inibitória (RUBIN et al., 1996; RUBIN et al., 1997). Também observou-se que os DG protegem contra a lesão neuronal e contra convulsões induzidas pela injeção de ácido quinolínico (um análogo dos receptores do sub-tipo NMDA) no cérebro de ratos e camundongos (MALCON et al., 1997; SCHIMIDT et al., 2000; LARA et al., 2002).

Demonstrou-se que os DG podem ser liberados de células gliais (astrócitos) em cultivo e que a quantidade destes compostos eleva-se rapidamente após um período de hipóxia/hipoglicemia e permanece nestes níveis após o insulto (CICCARELLI et al., 1999). Além disso, a presença de DG no espaço extracelular foi demonstrada pela análise do fluido cerebrospinal de humanos (REGNER et al., 1997). A interação dos DG com os receptores de glutamato provavelmente apresenta implicações clínico-patológicas nos processos de lesão celular no SNC, quando estes nucleotídeos podem ser liberados no espaço extracelular devido à permeabilização das células (TATHAN & LINDAU, 1991).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que GMP foi capaz de prevenir o dano celular induzido por glutamato e agonistas em fatias de hipocampo de ratos submetidas a um modelo de isquemia química (MOLZ et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002).

Considerando o que foi exposto, o presente estudo pretende avaliar a neurotoxicidade induzida por glutamato em fatias de hipocampo de ratos, dando ênfase à investigação do tipo de morte celular (apoptose ou necrose) desencadeada pela ativação de seus receptores e o possível papel neuroprotetor do GMP frente à neurotoxicidade glutamatérgica.

1.5- OBJETIVO GERAL

Avaliar a neurotoxicidade induzida por glutamato em fatias de hipocampo de ratos, discriminando o tipo de morte celular (apoptose ou necrose) envolvida neste dano neural e o possível papel protetor do GMP frente à neurotoxicidade glutamatérgica.

1.5.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar diferentes doses e tempos de incubação com glutamato e agonistas para evidenciar o comprometimento da viabilidade celular e o efeito do GMP.
- Avaliar a participação da morte celular apoptótica no dano neural desencadeado por glutamato e o papel do GMP neste processo.
- Avaliar as vias de sinalização intracelular que podem estar envolvidas na morte celular induzida por glutamato e o possível papel modulador do GMP. Será dado ênfase à modulação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), devido ao seu importante papel na manutenção de viabilidade e indução de dano celular.

2-METODOLOGIA

2.1-MATERIAIS

(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imina (MK-801), 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX), γ -D-glutamilamino-metilsulfonato (GAMS), foram obtidos da RBI-Research Biochemicals International[®], MA, USA. Acrilamida, anticorpo anti-fosfo ERK mouse, bis-acrilamida, brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), azul de bromofenol, dimetil sulfóxido (DMSO), ácido etileno-dinitrilo-tetracético (EDTA), Folin-Cicalteu, guanosina-5'-monofosfato (GMP), L-glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA), soro albumina bovina e staurosporina foram obtidos da Sigma[®], St. Louis, MO, USA. β -mercaptoetanol, ácido bórico, anticorpos secundários anti-mouse ou anti-rabbit conjugados à peroxidase, brometo de etídio, glicina, Kit de extração de DNA (GenomicPrepTM-Cells and Tissue DNA Isolation Kit), Kit ECL, nitrocelulose, padrão de pares de bases, persulfato de amônia, duodecil sulfato de sódio (SDS), N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), e Tris (hidroxi-metil-amino-metano) foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech[®]. Os anticorpos anti-ERK rabbit, anti-fosfo-p38^{MAPK} rabbit, anti-p38^{MAPK} foram obtidos da CALBIOCHEM[®]. O anticorpo anti-citocromo c foi obtido da ONCOGENE[®]. Padrão de peso molecular, BCIP e NBT foram obtidos da BIO-RAD[®]. Ácido hidroxietil-piperazina-etanosulfônico (HEPES), Ponceau e Tween-20 foram obtidos da USB[®]. As soluções reveladora e fixadora foram obtidos da KODAK[®]. Meio de cultura (meio de Eagle modificado por Dubelcco, DMEM) foi obtido da GIBCO[®]. Proteinase K foi obtida da Boehringer Mannheim. Kit para dosagem de LDH foi obtido da Analisa Diagnóstica[®]. Todos outros reagentes são de qualidade analítica e foram obtidos de fornecedores comerciais padrão.

2.2-EQUIPAMENTOS

Aparato para gel gradiente da BioRad[®], balança analítica SCIENTECH[®] modelo SA 120, centrífuga refrigerada 5804R – Eppendorf[®], cuba de eletrotransferência HOEFER[®] modelo TE 22, cuba para eletroforese HOEFER[®] Mighty Small, espectrofotômetro Ultrospec 3000 – Pharmacia Biotech[®], fonte para eletroforese Amersham Pharmacia Biotech[®] modelo EPS 301, leitora de Elisa Microplate Reader 2001 – Whittaker Bioproducts[®], McIlwain Tissue Chopper – Brinkmann Laboratory Products[®],

2.3-ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos jovens (23 a 25 dias) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no biotério setorial de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica, em ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura entre 22 e 25 °C e com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos com os animais seguiram os códigos de ética para utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pela CEUA/UFSC (nº 060/CEUA-23080.001056/2001-23).

2.4- PREPARAÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAIS

Os animais foram mortos por decapitação e os hipocampos rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB; composto por NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl_2 1,3 mM; MgSO_4 1,2 mM; KH_2PO_4 0,4 mM; NaHCO_3 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95 % O_2 – 5 % CO_2) para atingir o pH 7,4. As fatias (0,4 mm de espessura) foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecido (McIlwain Tissue Chopper) e pré-incubadas em tampão KRB por 30 min a 37 °C, para permitir a recuperação metabólica do tecido.

2.5-EXPOSIÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAIS AO INSULTO GLUTAMATÉRGICO

Para determinarmos o protocolo a ser utilizado na indução de insulto glutamatérgico, após a pré-incubação, as fatias foram incubadas na situação controle, ou com glutamato, NMDA, ou H_2O_2 (em diferentes concentrações e tempos de incubação, conforme especificado nos Resultados). As fatias foram mantidas em um meio de incubação composto por 50 % de KRB, 50 % de meio de cultura (DMEM), 20 mM de HEPES e 100 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, a 37° C e em atmosfera contendo 5 % de CO_2 . Quando avaliado o efeito do GMP e de antagonistas glutamatérgicos (MK-801, GAMS, DNQX, M-CPG), os mesmos foram pré-incubados, ou adicionados simultaneamente ao glutamato, permanecendo por 1 hora de incubação. O meio é substituído e as fatias são usualmente mantidas em incubação por 6 horas adicionais. Em alguns experimentos, após a incubação de 1 hora com glutamato, as fatias foram mantidas por 3 horas (quando da avaliação da liberação do citocromo c), ou por 18 ou 24 horas (para análise da

fragmentação do DNA) em meio de cultura.

2.6- AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, ou Thiazolyl blue). O MTT é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido em um formazam púrpura após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983). Após o período de incubação, as fatias foram incubadas com MTT 0,5 mg/ml (em KRB) por 20 min a 37 °C e o formazam reduzido foi solubilizado pela adição de dimetil-sulfóxido. A avaliação da viabilidade celular foi medida em um leitor de Elisa (550 nm).

2.7- AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE LDH

A atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio extracelular foi medida através da utilização de um Kit (Analisa Diagnóstica®). A LDH na presença de NAD^+ catalisa a oxidação do lactato, produzindo piruvato, NADH e H^+ . O NADH reduz o metasulfato de fenazina, que em uma reação acoplada, reduz estequiometricamente o cloreto de iodofenil-nitrofenil tetrazolio. A absosbância do formazan de cor vermelha formado, medida em 550nm, é diretamente proporcional à atividade da LDH. A LDH total foi determinada pela adição de 10 %

de Triton X-100 e ruptura mecânica das fatias. Esta atividade foi considerada como 100% (WHITAKER, 1969).

2.8-SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE (SDS-PAGE)

2.8.1-AVALIAÇÃO DA VIA DAS MAPK

Após a incubação, as fatias foram solubilizadas em tampão de amostra contendo duodecil sulfato de sódio (SDS) 4%, Tris 50 mM, EDTA 100mM e β -mercaptoetanol 8 %, pH 6,8) e uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteína. Em seguida foi adicionada a solução de diluição de amostra (glicerol 40 %, Tris 25mM e azul de bromofenol; pH 6.8) numa proporção de 25:100 (v/v). As proteínas (100 μ g/poço) foram separadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), usando gel de separação com gradiente de acrilamida 7,5 a 15 % e gel de entrada composto por acrilamida 4 % (BUNN *et al.*, 1995). Para o preparo dos géis foi utilizado um aparato para gradiente da BioRad®, que continha dois compartimentos, A e B. Ao compartimento B, adicionou-se 10ml da mistura de gel 7,5 % (acrilamida/ bis-acrilamida 7,5 % - 37,5:1 (w/w), Tris 375 mM, SDS 0,1 %, TEMED 0,06 % e persulfato de amônia 0,036 %; pH 8,8) e no compartimento A, adicionou-se 10 ml da mistura de gel 15 % (acrilamida/bis-acrilamida 15 % - 37,5:1 (w/w), Tris 375 mM, SDS 0,1 %, glicerol 15 %, TEMED 0,06 % e persulfato de amônia 0,036; pH 8,8). Após o preenchimento da placa o gel permaneceu em repouso durante 1 hora para polimerização. Logo a seguir adicionou-se o gel de entrada (acrilamida/bis-acrilamida 4 % - 37,5:1 (w/w), Tris 125 mM, SDS 0,1 %, TEMED 0,05 % e persulfato de amônia 0,1 %; pH 6,8). Após 3 horas foram aplicadas as amostras para separação. A eletroforese foi realizada com

corrente fixa de 10 mA e voltagem máxima de 130 mV (para 2 géis) durante a noite (aproximadamente 14 horas). Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência.

2.8.2-AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DO CITOCROMO C

Após a incubação, as fatias foram homogeneizadas em tampão de lise (sacarose 250 mM e digitonina 15,3 nM) e centrifugadas a 14000 g por 1 minuto (LEIST et al., 1999). O sobrenadante obtido, (fração citosólica), foi separado do precipitado. Ao precipitado foi adicionado 100 µl de tampão de amostra. O sobrenadante foi liofilizado e solubilizado em tampão de amostra. Foi determinado o conteúdo proteico da fração citosólica e do precipitado. Em seguida foi adicionada a solução de diluição de amostra numa proporção de 25:100 (v/v, solução de diluição/amostra). As proteínas (50 µg/poço) foram separadas por SDS-PAGE usando gel de acrilamida à 14 % (acrilamida/ bis-acrilamida 14 % - 37,5:1 (w/w), Tris 375 mM, SDS 0,1 %, TEMED 0,06 % e persulfato de amônia 0,036 %; pH 8,8). Para o preparo dos géis foi utilizado cuba de eletroforese HOEFER[®] Mighty Small. Após o preenchimento da placa o gel permaneceu em repouso durante 1 hora para polimerização. Logo a seguir foi adicionado o gel de entrada composto por acrilamida 4 % (acrilamida/bis-acrilamida 4 % - 37,5:1 (w/w), Tris 375 mM, SDS 0,1 %, TEMED 0,05 % e persulfato de amônia 0,1 %; pH 8,8). Após 3 horas foram aplicadas as amostras para separação. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 30 mA e voltagem máxima de 130 mV (para 2 géis) por aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência.

2.9-ELETROTRANSFERÊNCIA E IMUNODETECÇÃO (WESTERN BLOT)

Após a eletroforese os géis foram fixados durante 1 hora em solução fixadora (de metanol 50 % e ácido acético 8 %) e em seguida lavados em tampão superior de eletroforese (Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1 %) por um período de 30 minutos. Posteriormente, os géis foram equilibrados em tampão de transferência (ácido bórico 500 mM e EDTA 40 mM; pH 8,9). As proteínas foram transferidas dos géis de eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (3 horas a 4 °C, 300 mA) no sentido do pólo negativo para o positivo. Após a eletrotransferência, as membranas foram coradas com solução de Ponceau (Ponceau 0,5 % e ácido acético 1 %) para controle de transferência e em seguida lavadas com TBS (Tris 10mM, NaCl 150mM, pH 7,5), para retirar o Ponceau. As membranas foram bloqueadas (1 hora) com leite desnatado 5 % em TBS em temperatura ambiente e a seguir lavadas por 3 vezes de 5 minutos com TBS-T (Tween-20-0,05 %, Tris10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Foi realizado um segundo bloqueio (1 hora) usando gelatina à 2,5 % em TBS, seguido de nova lavagem em TBS-T (BALDO, 1994; COLLINS & SIM, 1998).

Para detecção da forma fosforilada das MAPKs, as membranas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente com anticorpo primários específicos anti-fosfo-ERK1/2 (1:5000), ou durante 12 horas a 4 °C com anticorpo anti-fosfo p38^{MAPK} (1:1000). Para detecção do citocromo c, as membranas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com anticorpo primário anti-citocromo c (1:500). Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T e incubadas durante 1 hora em temperatura ambiente com anticorpo secundário específico (ligado à peroxidase). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram novamente

lavadas e posteriormente reveladas por emissão de quimioluminescência (Kit ECL), seguindo as recomendações do fabricante. Para detecção de ERK 1/2 e p38^{MAPK} total, as membranas foram incubadas por 2 horas com anti-ERK1/2 total (1:40000) e anti-p38^{MAPK} total (1:10000) e posteriormente foram reveladas através de kits de desenvolvimento de cor, utilizando NBT e BCIP como substratos, em tampão fosfatase alcalina (Tris 100 mM, NaCl 100 mM e MgCl₂ 5 mM; pH 9,5). As medidas de fosforilação ou imunoconteúdo das proteínas foram realizadas através de densitometria, utilizando o programa Scion Image – Release Beta 4.0.2.

2.10-ANÁLISE DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA

Após o período de incubação, fatias hipocâmpais correspondendo a 10 – 20 mg foram utilizadas para a extração de DNA. O tecido foi lisado e homogeneizado em um tampão de lise (GenomicPrepTM- Kit) e em seguida incubado a 65 °C por 1 hora. As proteínas e RNA liberados das células foram degradados pela incubação com proteinase K (100 µg/ml) e com RNase (20 µg/ml), a 55°C por 12 horas e a 37 °C por 1 hora, respectivamente. Ao homogeneizado obtido foi adicionada solução de precipitação (kit) e o precipitado formado foi centrifugado a 16.000 g por 15 min a 4 °C. Os ácidos nucleicos foram então sedimentados utilizando-se solução de isopropanol 100 % a 4 °C durante um período de 12 horas e posteriormente centrifugados a 16.000 g por 30 min. Aos precipitados formados adicionou-se etanol 70 % com posterior centrifugação a 16.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e

adicionou-se uma solução de reidratação (kit). Amostras de 40 µg do DNA obtido foi submetido a uma eletroforese em um gel de agarose a 2 % com brometo de etídio (100 µg/ml) e posteriormente visualizado utilizando-se um transiluminador como fonte de luz ultravioleta (YAN & PAUL, 1997).

2.11-DOSAGEM DE PROTEÍNAS

O conteúdo proteico das amostras foi determinado pelo método de LOWRY e colaboradores (1951), ou pelo método de PETERSON (1977), quando as fatias foram solubilizadas em tampão de amostra contendo SDS. Utilizou-se albumina bovina sérica como padrão.

2.12-ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Duncan, quando necessário. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3-RESULTADOS

3.1-PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE INJÚRIA CELULAR INDUZIDA POR GLUTAMATO EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS

3.1.1-Determinação da viabilidade celular de fatias de hipocampo submetidas a diferentes tempos de incubação

Com o objetivo de estudar o dano celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à incubação com glutamato, iniciou-se testando a manutenção da viabilidade celular das fatias de hipocampo quando incubadas por diferentes tempos na situação controle (fatias incubadas em meio de cultura, após o período de pré-incubação). Os parâmetros utilizados no estudo da manutenção da viabilidade celular foram a redução do MTT, liberação de LDH, assim como a avaliação do conteúdo proteico.

Na Figura 2, avaliou-se a concentração de proteínas nas fatias de hipocampo de ratos incubadas em situação controle e submetidas a diferentes períodos de incubação (1, 3, 6, 18 ou 24 horas). Observou-se que não houve variação na concentração de proteínas nos diferentes períodos de incubação, ou seja, não houve perda significativa do número de células.

Na Figura 3, verificou-se que houve uma diminuição significativa na viabilidade celular das fatias de hipocampo incubadas a partir de 12 horas, a qual também é observada após 18 e 24 horas de incubação.

Na Figura 4, observou-se um aumento significativo na liberação da LDH pelas fatias de hipocampo incubadas por 12, 18 e 24 horas. Este parâmetro demonstra uma permeabilização na membrana celular, com perda de conteúdo citosólico.

Sendo assim, foi possível padronizar o período de 6 horas de incubação com o meio de cultura, como o que apresenta melhores condições fisiológicas e sem alteração na viabilidade celular das fatias de hipocampo de ratos.

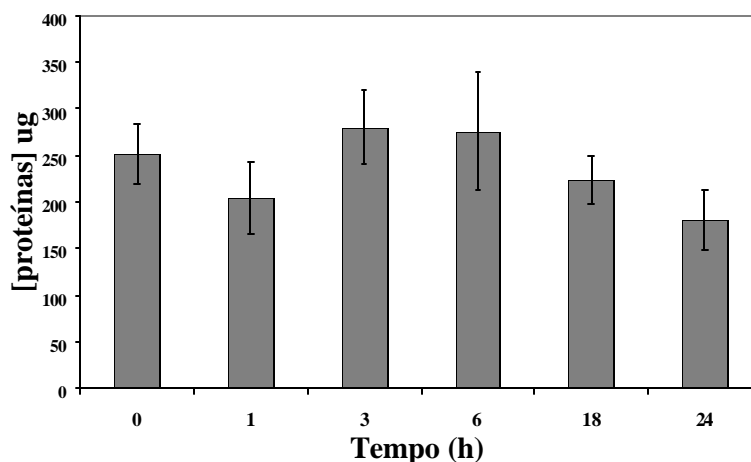


Figura 2. Avaliação da concentração de proteínas em fatias de hipocampo de ratos incubadas em meio fisiológico e submetidas a diferentes períodos de incubação. As fatias foram incubadas por 0 horas (h), 1h, 3h, 6h, 18h e 24h em meio de cultura. As proteínas foram dosadas pelo método de LOWRY et al. (1951). Os valores representam a média \pm erro padrão de 6 experimentos realizados em triplicatas.

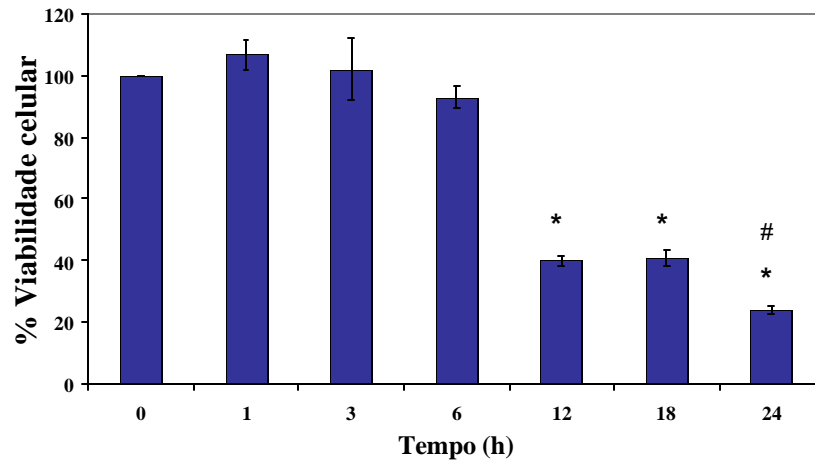


Figura 3. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos incubadas em meio fisiológico e submetidas a diferentes períodos de incubação. As fatias foram incubadas por 0 horas (h) , 1h, 3h, 6h, 12h, 18h e 24h em meio de cultura. Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método de redução de MTT. Os valores representam a média \pm o erro padrão de 6 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias significativamente diferentes dos grupos 0h, 1h, 3h e 6h; $p < 0,05$; # indica médias significativamente diferentes dos grupos 0h, 1h, 6h e 12h; $p < 0,01$.

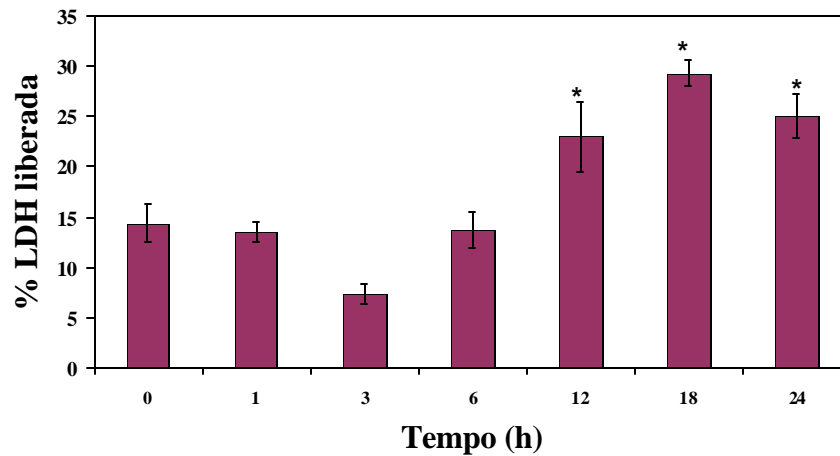


Figura 4. Avaliação da liberação de LDH em fatias de hipocampo de ratos incubadas em meio fisiológico e submetidas a diferentes períodos de incubação. As fatias foram incubadas por 0 horas (h), 1h, 3h, 6h, 12h, 18h, 24h em meio de cultura. A liberação da LDH foi realizada através da avaliação de sua atividade no meio sobrenadante das fatias. Os valores representam a média \pm erro padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias significativamente diferentes dos grupos, 0h, 1h, 3h e 6h; $p < 0,01$.

3.1.2-Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a diferentes tempos de incubação e concentrações de glutamato

Com o objetivo de determinar a concentração de glutamato capaz de produzir excitotoxicidade, as fatias de hipocampo de ratos foram incubadas na presença de concentrações crescentes de glutamato em diferentes tempos de incubação.

Para tanto, as fatias foram incubadas durante 1, 3 ou 6 horas na presença de glutamato 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M ou 1 mM. As fatias que foram submetidas ao glutamato durante 1 e 3 horas foram incubadas em tampão KRB. As fatias que foram submetidas ao período de incubação de 6 horas, permaneceram por até 3 horas em tampão KRB, e após este período o meio de incubação foi trocado para meio de cultura D-MEM. Para controle, determinou-se a viabilidade celular e a liberação de LDH das fatias logo após o período de pré-incubação.

Não observou-se diferença significativa na viabilidade celular entre as concentrações de glutamato utilizadas em cada tempo de incubação (Fig. 5). Porém, as fatias submetidas à incubação por 6 horas com 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M ou 1 mM de glutamato apresentaram uma perda significativa de viabilidade em relação às fatias incubadas por 1 e 3 horas nestas mesmas concentrações de glutamato. A perda da viabilidade celular das fatias de hipocampo incubadas por 6 horas foi a mesma em todas as concentrações de glutamato.

Na Figura 6 não observou-se diferença significativa na liberação de LDH entre as concentrações de glutamato durante 1, 3 e 6 horas de incubação. Porém nas fatias de hipocampo incubadas por 6 horas observa-se uma tendência, não significativa, de aumento na liberação de LDH. Esta ausência de liberação de LDH, indica que não houve alteração na permeabilidade da

membrana celular nestes períodos de incubação na presença das diferentes concentrações de glutamato.

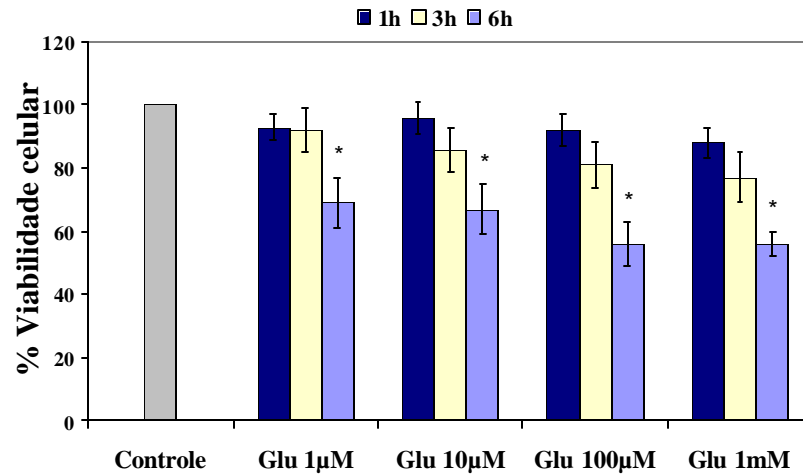


Figura 5. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos incubadas por 1, 3, ou 6 horas na presença de diferentes concentrações de glutamato. As fatias foram incubadas com glutamato (Glu) nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M ou 1 mM por 1 hora (h), 3h ou 6h. Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método de redução de MTT. Os valores representam a média \pm erro padrão de 7 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias significativamente diferentes dos grupos incubados por 1h, 3h e do grupo controle; $p < 0,05$.

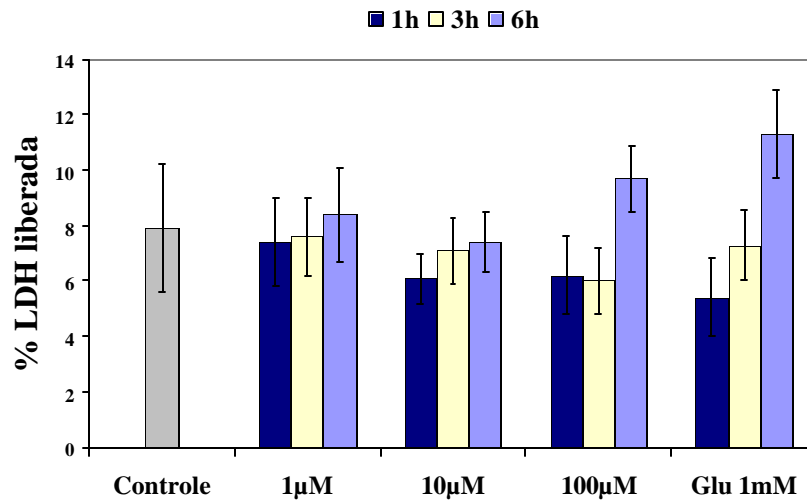


Figura 6. Avaliação da liberação da LDH em fatias de hipocampo de ratos incubadas por 1, 3, ou 6 horas na presença de diferentes concentrações de glutamato. As fatias foram incubadas com glutamato (Glu) nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M ou 1 mM por 1 hora (h), 3h ou 6h. A liberação da LDH foi realizada através da avaliação de sua atividade no meio sobrenadante das fatias. Os valores representam a média \pm erro padrão de 7 experimentos realizados em triplicatas.

Considerando-se que em 6 horas de incubação foi observado toxicidade induzida por glutamato, também verificou-se neste período de incubação o envolvimento de receptores específicos, e um possível envolvimento de espécies reativas de oxigênio na alteração da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos. As fatias foram submetidas ao tratamento com o agonista glutamatérgico, NMDA e com peróxido de Hidrogênio (H_2O_2). Glutamato (10 μ M, 1 mM, 10 mM), NMDA (100 μ M) e H_2O_2 (20 μ M e 100 μ M) foram incubados por 6 horas em meio de cultura.

Observou-se que houve diminuição significativa na viabilidade celular em fatias de hipocampo incubadas com 1 mM ou 10 mM de glutamato e H_2O_2 (20 μ M ou 100 μ M) em relação às fatias controle (Fig. 7). Não foi observada alteração significativa na viabilidade celular das fatias de hipocampo incubadas com Glu 10 μ M. Este resultado contrasta com o previamente observado, quando esta concentração de glutamato causava diminuição na viabilidade celular (Fig. 5). Isto poderia indicar que a manutenção das fatias durante todo o tempo de incubação (6 horas) em meio de cultura as torna mais resistentes à perda da viabilidade celular induzida por Glu 10 μ M. NMDA (100 μ M) também não apresentou diferença significativa na viabilidade celular em relação às fatias controle (Fig 7).

Através da avaliação da atividade da LDH (Fig. 8) observou-se que não houve variação significativa na liberação celular a partir das fatias de hipocampo em todos os tratamentos em relação ao controle.

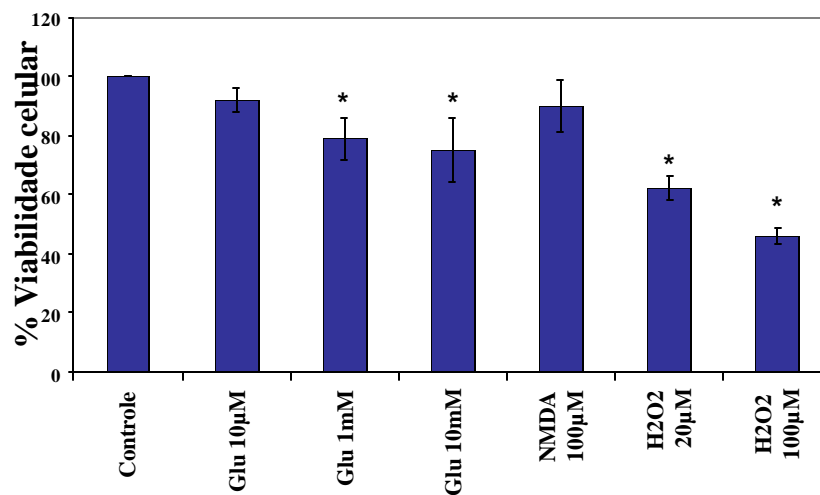


Figura 7. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos incubadas por 6 horas na presença de glutamato, NMDA e H_2O_2 . As fatias foram incubadas por 6 horas em meio de cultura contendo Glutamato (Glu) 10 μ M, 1 mM, ou 10 mM; NMDA 100 μ M, H_2O_2 20 μ M ou 100 μ M. Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método de redução de MTT. Os valores representam a média \pm erro padrão de 6 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias significativamente diferentes do controle; $p < 0,05$.

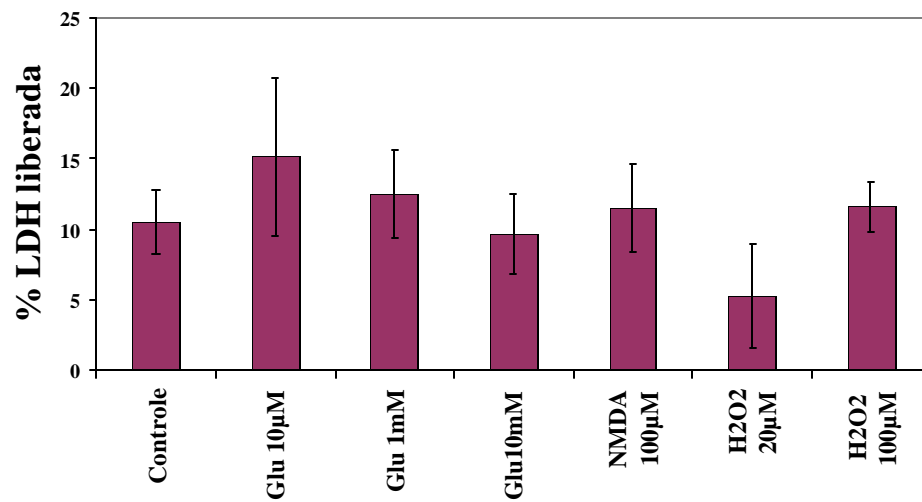


Figura 8. Avaliação da liberação de LDH em fatias de hipocampo de ratos incubadas por 6 horas na presença de glutamato, NMDA e H₂O₂. As fatias foram incubadas por 6 horas com Glutamato (GLU) 10 µM, 1 mM, ou 10 mM; NMDA 100 µM; H₂O₂ 20 µM, ou 100 µM. A liberação da LDH foi realizada através da avaliação de sua atividade no meio sobrenadante das fatias. Os valores representam a média ± erro padrão de 6 experimentos realizados em triplicatas.

Devido às variações observadas com os resultados obtidos utilizando-se glutamato na concentração de 10 μ M (Figs. 5 e Fig. 7), o modelo de incubação foi modificado para 1 hora de insulto na presença de glutamato, seu agonista NMDA, ou H_2O_2 . O meio então é trocado para o meio de cultura e as fatias são incubadas por 6 horas adicionais. Este modelo de incubação tem sido largamente utilizado na literatura para avaliação de dano excitotóxico (para revisão, ver OBRENOVITCH & URENJAK, 1997).

Verificou-se uma diminuição significativa da viabilidade celular em relação ao controle nos grupos: Glu 1 mM e 10 mM, NMDA 100 μ M e H_2O_2 20 μ M e 100 μ M (Fig. 9). Staurosporina, um inibidor de proteínas quinases, foi utilizado como um controle positivo para morte celular induzida por apoptose (THOMAS & MAYLE, 2000). Houve uma tendência não significativa de redução de viabilidade celular.

Não foi observada alteração significativa na liberação da LDH em nenhum tratamento utilizado (Fig. 10).

Constatou-se que desta forma é possível reproduzir mais efetivamente o efeito do glutamato, NMDA e H_2O_2 , tendo padronizado a incubação de 1 hora, seguida de 6 horas adicionais somente com meio de cultura. Além disto, este modelo reproduz mais efetivamente a injúria causada por danos excitotóxicos agudos (trauma cerebral, isquemia) onde ocorre uma liberação massiva de glutamato induzindo a ativação de seus receptores com consequente produção de radicais livres e dano oxidativo (OBRENOVITCH & URENJAK, 1997).

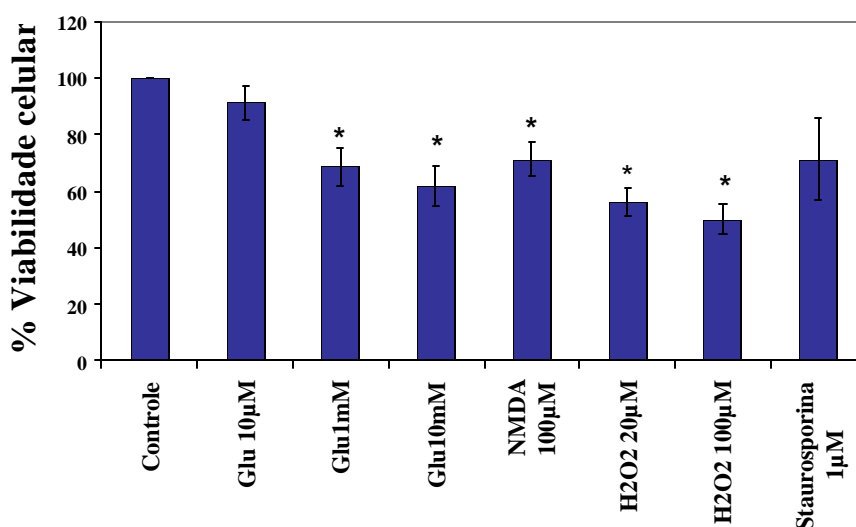


Figura 9. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos incubadas por 1 hora com glutamato, NMDA, H₂O₂ e staurosporina e submetidas a 6 horas adicionais de incubação em meio de cultura. As fatias foram incubadas por 1 hora (h) com Glutamato (Glu) 10 µM, 1 mM, ou 10 mM; NMDA 100 µM; H₂O₂ 20 µM ou 100 µM; Staurosporina 1 µM. O meio foi substituído por meio de cultura e as fatias foram mantidas por 6 h adicionais. A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método de redução do MTT. Os valores representam a média \pm erro padrão de 6 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias significativamente diferentes do controle; $p < 0,01$.

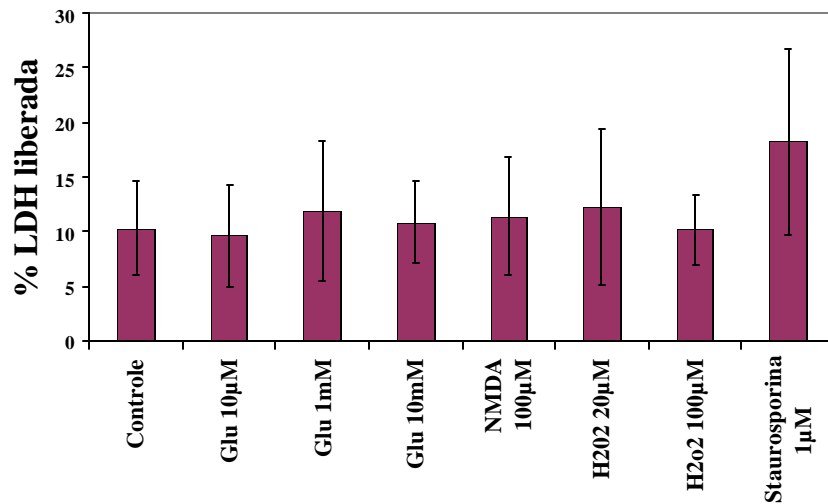


Figura 10. Avaliação da liberação de LDH em fatias de hipocampo de ratos incubadas por 1 hora com glutamato, NMDA, H_2O_2 e staurosporina e submetidas a 6 horas adicionais de incubação em meio de cultura. As fatias foram incubadas por 1 hora (h) com Glutamato (Glu) 10 μ M, 1 mM, ou 10 mM; NMDA 100 μ M; H_2O_2 20 μ M ou 100 μ M; Staurosporina 1 μ M. O meio foi substituído por meio de cultura e as fatias foram mantidas por 6 h adicionais. A liberação da LDH foi realizada através da avaliação de sua atividade no meio sobrenadante das fatias. Os valores representam a média \pm erro padrão de 7 experimentos realizados em triplicatas.

3.2-AVALIAÇÃO DO PAPEL DO GMP NA TOXICIDADE CELULAR INDUZIDA POR GLUTAMATO E NMDA EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS

Tendo em vista que o modelo de insulto glutamatérgico, onde as fatias de hipocampo de ratos foram incubadas durante 1 hora na presença de glutamato e posteriormente mantidas por 6 horas adicionais em meio de cultura, mostrou-se o mais adequado para se avaliar a perda da viabilidade celular, verificou-se neste modelo o possível papel protetor de 1 mM de GMP. Esta concentração de GMP foi escolhida por ter apresentado efeito neuroprotetor parcial em estudos anteriores (MOLZ et al. 2001, OLIVEIRA et al., 2002).

As fatias foram incubadas com glutamato 10 μ M, 1 mM, 10 mM juntamente com GMP por 1 hora. Não observou-se efeito protetor do GMP frente à perda da viabilidade celular induzida por glutamato (Fig. 11). Também não foram observadas alterações na viabilidade celular quando GMP 1 mM era pré-incubado por 30 minutos, ou mantido durante as 6 horas adicionais de incubação em meio de cultura (dados não mostrados), observando-se o mesmo perfil mostrado na Fig. 11.

Quando a concentração de GMP foi aumentada, observou-se redução na viabilidade celular tanto quando as fatias foram incubadas somente com 5 mM de GMP ou GMP em combinação com todas as concentrações de glutamato (Figura 12).

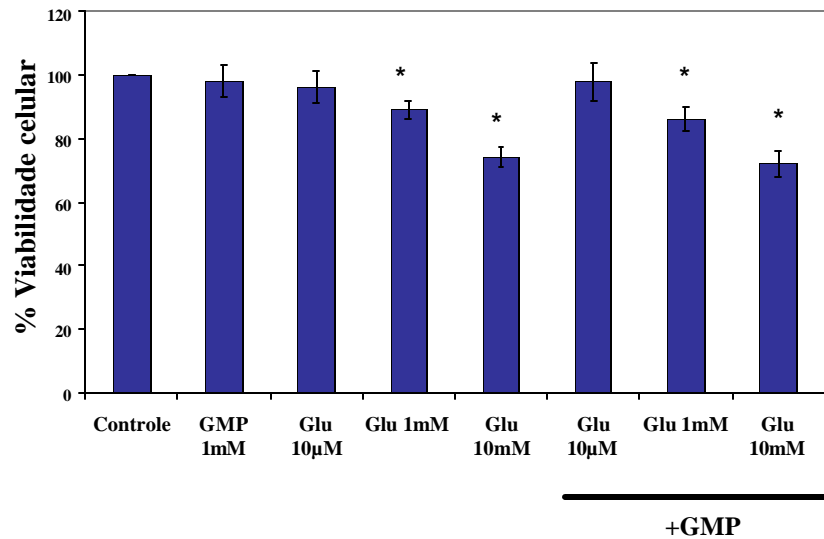


Figura 11. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos tratadas com glutamato na presença ou ausência de GMP. As fatias de hipocampo foram incubadas por 1h com GMP 1 mM, glutamato (Glu) 10 µM, 1 mM e 10 mM, NMDA 100 µM, na presença ou ausência de GMP 1 mM. O meio foi substituído por meio de cultura e as fatias foram mantidas por 6 h adicionais de incubação. A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método de redução do MTT. Os valores representam a média \pm erro padrão de 9 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias significativamente diferentes do controle, $p < 0,05$.

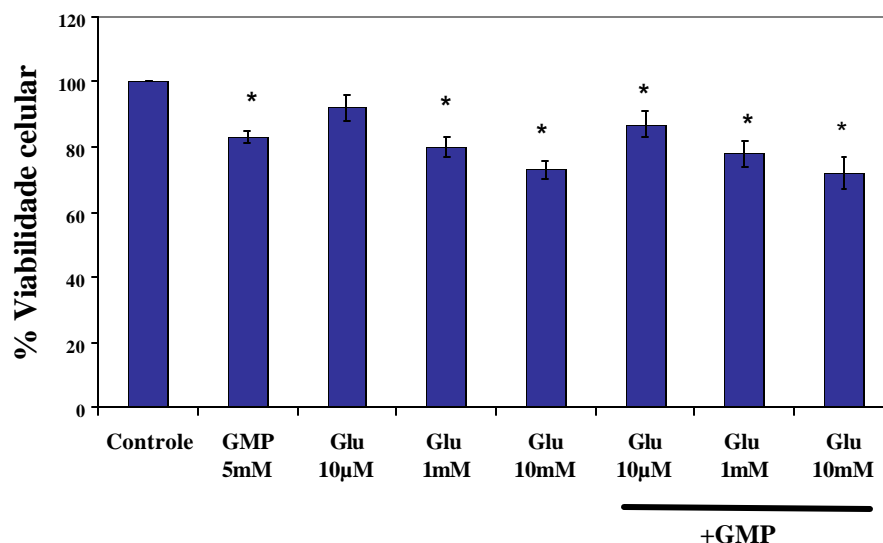


Figura 12. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos tratadas com glutamato e GMP 5mM. As fatias tratadas com GMP foram pré-incubadas com GMP 5 mM por 30 min, e em seguida foram incubadas por 1 hora (h) com GMP 5 mM, Glutamato (Glu) 10 µM, 1 mM e 10 mM na presença ou ausência de GMP 5 mM. O meio foi substituído por meio de cultura contendo GMP 5 mM e as fatias foram mantidas por 6h adicionais de incubação. A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método de redução do MTT. Os valores representam a média \pm erro padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias significativamente diferentes do controle e do grupo Glu 10 µM, $p < 0,05$.

Para avaliar o efeito do GMP na perda de viabilidade celular induzida pela ativação de receptores específicos de glutamato, as fatias foram incubadas por 1 hora com NMDA 100 μ M, na presença ou ausência de GMP, e posteriormente mantidas por 6 horas adicionais em meio de cultura. Pode-se verificar através da Fig. 13 que a incubação simultânea de NMDA e GMP recupera a perda de viabilidade celular induzida por NMDA.

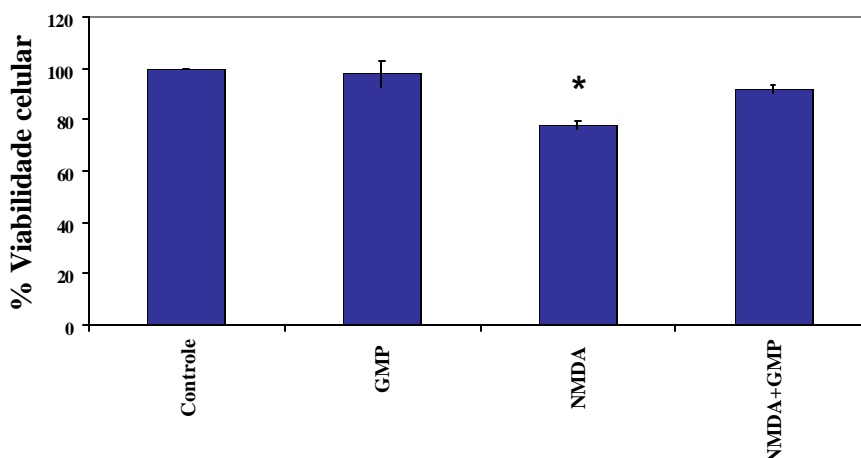


Figura 13. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos tratadas com NMDA e GMP. As fatias foram incubadas por 1 hora (h) com GMP 1 mM, NMDA 100 μ M e NMDA 100 μ M na presença de GMP 1 mM. O meio foi substituído por meio de cultura e as fatias foram mantidas por 6h adicionais de incubação. A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método de redução do MTT. Os valores representam a média \pm erro padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias significativamente diferentes do controle

3.3-AVALIAÇÃO DO SUBTIPO DE RECEPTOR GLUTAMATÉRGICO ENVOLVIDO NO DANO CELULAR INDUZIDO POR GLUTAMATO EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS

3.3.1-Envolvimento de receptores ionotrópicos

Com o objetivo de determinar os subtipos de receptores glutamatérgicos envolvidos na morte celular induzida por glutamato (1mM e 10mM) em fatias de hipocampo, foi testado o efeito de antagonistas ionotrópicos clássicos como o GAMS (antagonista de receptor do subtipo KA), DNQX (antagonista de receptores KA e AMPA) e MK-801 (antagonista de receptor NMDA) sobre a perda da viabilidade celular.

As fatias foram pré incubadas com GAMS 50 μ M, DNQX 50 μ M e MK-801 50 μ M por 30 minutos antes da adição de glutamato e mantidos durante a 1 hora de incubação com glutamato. Pode-se observar na Figura 14 que a incubação GAMS e MK-801 recuperam a perda da viabilidade celular induzida por glutamato 1 e 10 mM. Este efeito não foi observado na presença de DNQX.

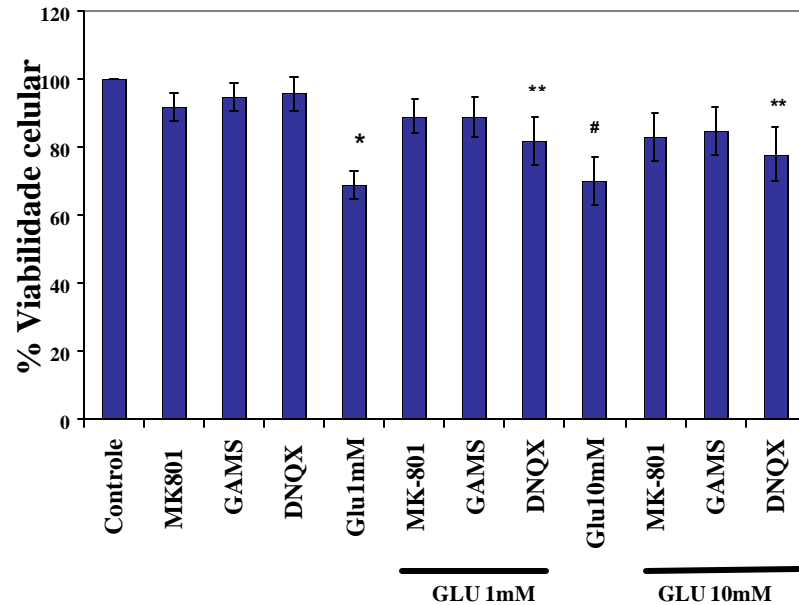


Figura 14. Efeito de antagonistas ionotrópicos sobre a viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos tratadas com glutamato. As fatias foram pré-incubadas com MK-801 50 μ M, GAMS 50 μ M e DNQX 50 μ M por 30 min, e em seguida foram incubadas por 1 hora (h) com os antagonistas, Glutamato (Glu) 10 μ M, 1 mM e 10 mM e com Glu na presença dos antagonistas. O meio foi substituído por meio de cultura contendo os antagonistas e as fatias foram mantidas por 6 h adicionais. A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método de redução do MTT. Os valores representam a média \pm erro padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias significativamente diferentes do controle, e dos grupos MK 801, GAMS e DNQX , Glu 1mM + MK 801 , Glu 10mM + MK 801. # indica a média diferente do controle e dos grupos MK 801, GAMS e DNQX . ** indica as médias diferentes do controle, $p < 0,05$.

3.3.2-Envolvimento de receptores metabotrópicos

Com o objetivo de determinar o envolvimento de receptores metabotrópicos na morte celular induzida por glutamato (1mM e 10mM) em fatias de hipocampo, foi testado o efeito do antagonista metabotrópico não seletivo, M-CPG, na perda da viabilidade celular.

As fatias foram pré incubadas com M-CPG 0,5 mM por 30 minutos antes da adição de glutamato e mantidos durante a 1 hora de incubação com glutamato. M-CPG não tem efeito sobre a perda da viabilidade celular induzida por glutamato 1 mM. No entanto, M-CPG recupera a perda de viabilidade celular causada por glutamato 10 mM (Fig. 15).

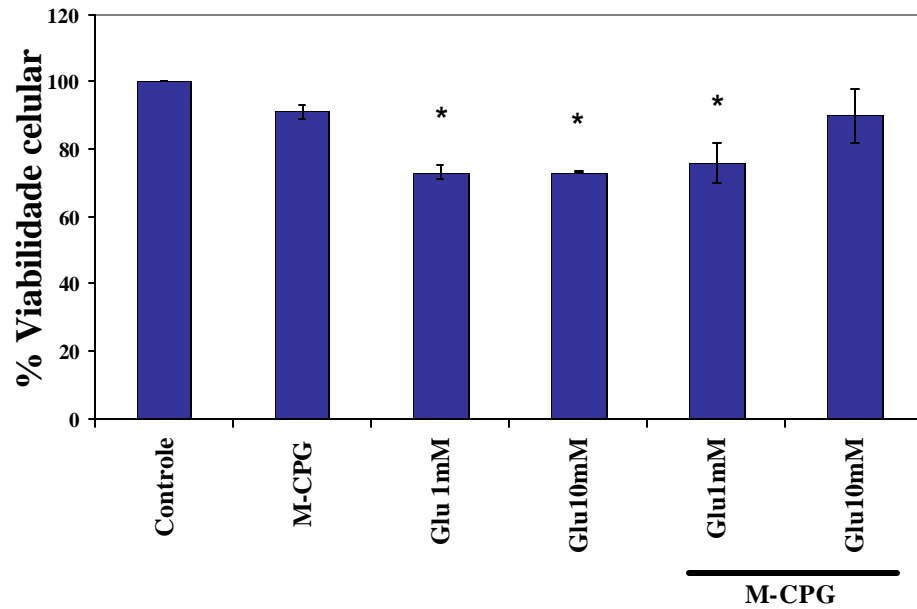


Figura 15. Efeito do M-CPG sobre a viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos tratadas com glutamato. As fatias foram pré-incubadas com M-CPG 0,5 mM por 30 min, e em seguida foram incubadas por 1 hora (h) M-CPG 0,5 mM, Glutamato (Glu) 1 mM e 10 mM, na presença ou ausência de M-CPG 0,5 mM. O meio foi substituído por meio de cultura contendo M-CPG 0,5 mM e as fatias foram mantidas por 6h adicionais. A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método de redução do MTT. Os valores representam a média \pm erro padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias significativamente diferentes do controle, $p < 0,05$.

3.4-AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA INDUZIDA POR GLUTAMATO E GMP EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS

Diversos estudos consideram a indução de fragmentação de DNA como um parâmetro para a caracterização de morte celular por apoptose (ISHIMARU et al., 1999; SASTRY & RAO, 2000; GARRIDO et al., 2001). Tem sido demonstrado que glutamato pode levar à morte celular por apoptose com fragmentação do DNA em culturas de células neuronais (ANKARCRONA et al, 1995; QIN et al., 1996; HIRASHIMA et al., 1999), mas não foi ainda relatada a indução de fragmentação de DNA utilizando como modelo fatias de hipocampo de ratos jovens. Portanto, utilizamos este parâmetro de morte celular apoptótica para caracterizar o tipo de morte celular induzida por glutamato. Fatias de hipocampo de ratos foram expostas às diferentes concentrações de glutamato por 1 hora e posteriormente submetidas por 6, 18 ou 24 horas de incubação adicional em meio de cultura.

A Figura 16 mostra o padrão de migração eletroforética em gel de agarose de amostras de DNA extraídas de fatias de hipocampo de ratos submetidas a GMP 1mM, glutamato (10 μ M, 1 mM e 10 mM), na presença ou ausência de GMP, NMDA 100 μ M e staurosporina 1 μ M. Posteriormente, as fatias foram mantidas por mais 6 horas em meio de cultura. Nesta figura pode-se verificar que glutamato em todas as concentrações utilizadas promoveu um pequeno aumento na fragmentação de DNA quando comparado com as fatias controles. Tal efeito também foi observado na presença de NMDA e Staurosporina (dados não mostrados). GMP promove um aumento na fragmentação de DNA comparável àquele provocado por glutamato e a incubação das fatias com glutamato e GMP não altera o padrão de fragmentação observado quando as fatias eram incubadas apenas na presença de glutamato.

Como a apoptose é um processo ativo que envolve a síntese de novas moléculas, um tempo de incubação de 6 horas poderia não ser suficiente para observação de uma fragmentação de DNA significativa. Em vista disso, resolvemos aumentar o tempo de incubação para 18 ou 24 horas após o período de 1 hora de exposição ao glutamato para verificar se poderia ocorrer um aumento ainda maior na fragmentação do DNA.

Na Figura 17 as fatias foram mantidas por 18 horas adicionais em meio de cultura. Pode-se observar um aumento na fragmentação de DNA promovida por GMP e glutamato, em relação ao observado anteriormente. Quando glutamato foi incubado na presença de GMP, pode-se observar que GMP potencializou o aumento da fragmentação de DNA induzido por glutamato.

A incubação por 24 horas não aumentou o padrão de fragmentação induzido por GMP e glutamato além daquele observado após as 18 horas de incubação (dados não mostrados).

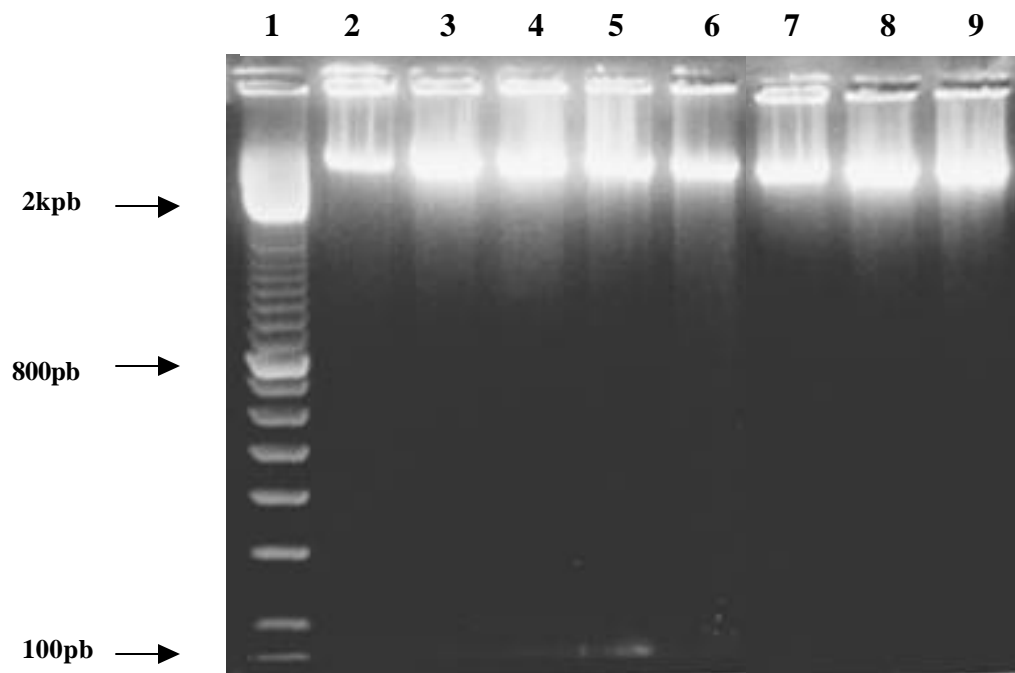


Figura 16. Análise da fragmentação internucleossomal do DNA em fatias de hipocampo tratadas com glutamato e GMP: As fatias de hipocampo foram incubadas por 1 hora com GMP 1 mM, glutamato (Glu) 10 μ M, 1 mM e 10 mM, na presença ou ausência de GMP 1 mM e posteriormente mantidas por 6h adicionais apenas em meio de cultura. A análise da fragmentação do DNA ocorreu por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito nos materiais e métodos. Marcador de DNA-100 pb (coluna 1); Controle (coluna 2); GMP 1 mM (coluna 3); Glu 10 μ M (coluna 4); Glu 1 mM (coluna 5); Glu 10 mM (coluna 6); Glu 10 μ M + GMP (coluna 7); Glu 1 mM + GMP (coluna 8); Glu 10 mM + GMP (coluna 9). Figura representativa de três experimentos.

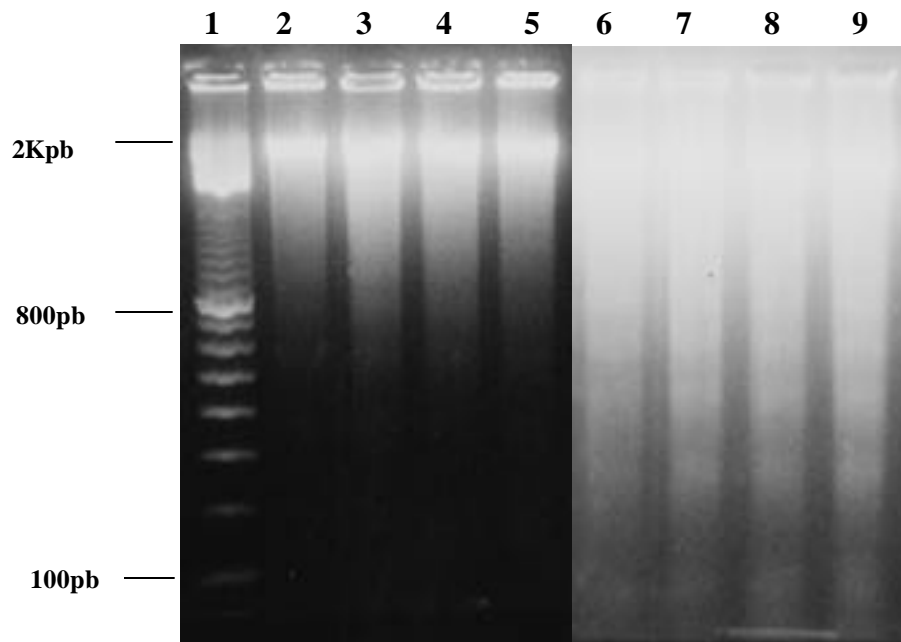


Figura 17. Análise da fragmentação internucleossomal do DNA em fatias de hipocampo tratadas com glutamato e GMP: As fatias de hipocampo foram incubadas por 1 hora (h) com GMP 1 mM, glutamato (Glu) 10 μ M, 1 mM e 10 mM, na presença ou ausência de GMP 1mM, e posteriormente mantidas por mais 18 h apenas em meio de cultura. A análise da fragmentação do DNA ocorreu por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito nos materiais e métodos. Marcador de DNA-100 pb (coluna 1); Controle (coluna 2); Glu 10 μ M (coluna 3); Glu 1 mM (coluna 4); Glu 10 mM (coluna 5); GMP 1 mM (coluna 6); Glu 10 μ M + GMP (coluna 7); Glu 1 mM + GMP (coluna 8); Glu 10 mM + GMP (coluna 9). Figura representativa de três experimentos.

3.5-AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DO CITOCROMO C INDUZIDA POR GLUTAMATO EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS

Para avaliar o envolvimento da liberação do citocromo c na toxicidade induzida por glutamato, as fatias foram incubadas durante 1 hora na presença de 10 μ M, 1 mM e 10 mM de glutamato e mantidas por 3 horas adicionais em meio de cultura. Após a incubação, as fatias foram lisadas e a fração citosólica (correspondente à fração que contém o citocromo c liberado da mitocôndria) foi separada do precipitado.

Nas fatias incubadas na situação controle ou com glutamato 10 μ M pode-se verificar a presença do citocromo c apenas na fração correspondente ao precipitado, indicando que não houve liberação do citocromo c nestas condições. Diferentemente, a incubação com glutamato 1 e 10 mM promoveram a liberação de 100 % do citocromo c detectável para o citosol das células (Fig 18).

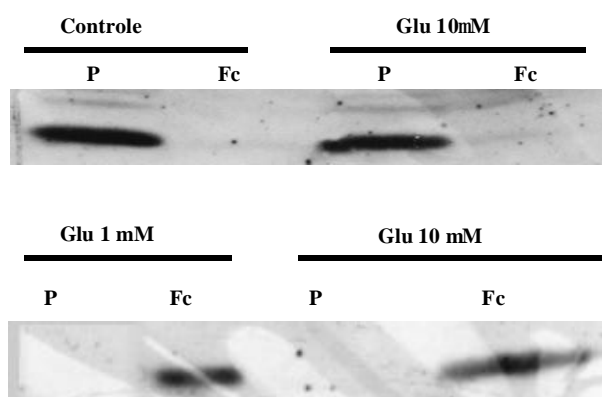


Figura 18. “Immunoblotting” representativo da liberação do citocromo c induzida por glutamato. As fatias de hipocampo foram incubadas por 1 hora (h) com glutamato (Glu) 10 μ M, 1 mM e 10 mM, mantidas por 3 h adicionais em meio de cultura e lisadas para obtenção da fração citosólica. C = controle, P = precipitado, FC = fração citosólica.

3.6-DETERMINAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DE MAPKS POR GLUTAMATO E GMP

3.6.1. Análise da fosforilação de ERK 1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens incubadas com glutamato e GMP

Estudos utilizando diferentes modelos celulares e regiões encefálicas demonstram o envolvimento da fosforilação e ativação de ERK 1/2 (JIANG et al., 2000; GRANT et al., 2001; PERKINTON et al., 2002; JIN et al., 2002) na morte celular apoptótica induzida pela estimulação de receptores glutamatérgicos.

Analisou-se a modulação de ERK 1/2 em fatias de hipocampo de ratos jovens incubadas por 1 hora na presença de GMP 1mM, glutamato 10 μ M, 1 mM e 10 mM, na presença ou ausência de GMP, e submetidas a 6 horas adicionais de incubação em meio de cultura.

A Figura 19A mostra os “imunoblottings” das formas fosforiladas de ERK 1/2 e a quantificação das bandas é mostrada na Figura 19 B. A fosforilação de ERK 1/2 foi expressa em porcentagem do controle (considerado 100%). Glutamato 1 e 10 mM promoveram diminuição significativa da fosforilação de ERK 2 (Figura 19 A e B). GMP não altera o efeito modulatório do glutamato sob a inibição da fosforilação da ERK 2. Não foi observado efeito modulatório do glutamato e do GMP sob a fosforilação de ERK 1.

Glutamato e GMP não alteram o imunoconteúdo de ERK 1/2 (Figura 19 C).

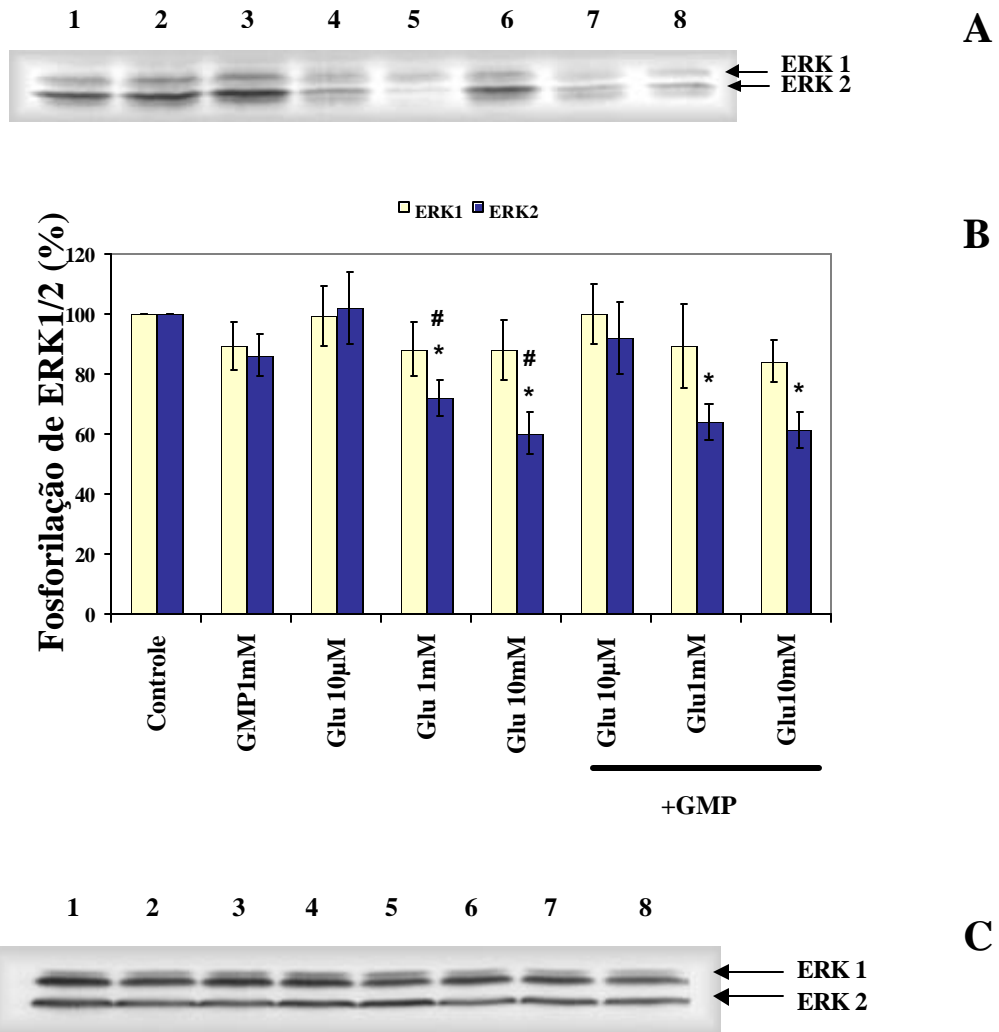


Figura 19. Avaliação da fosforilação da ERK 1/2 em fatias de hipocampo tratadas com glutamato e GMP 1 mM: As fatias de hipocampo foram incubadas por 1 hora com Glu 10 µM, 1 mM e 10 mM, na presença ou ausência de GMP 1 mM e posteriormente incubadas por 6h em meio de cultura. **A.** “Immunoblotting” representativo da fosforilação da ERK1/2. Controle (coluna 1); GMP 1 mM (coluna 2); Glu 10 µM (coluna 3); Glu 1 mM (coluna 4); Glu 10 mM (coluna 5); Glu 10 µM + GMP (coluna 6); Glu 1 mM + GMP (coluna 7), Glu 10 mM + GMP (coluna 8); **B.** Análise por densitometria da fosforilação da ERK1/2. Os valores representam a média \pm erro padrão de 10 - 13 experimentos realizados em triplicatas. * indica as médias significativamente diferentes do controle; # indica as médias significativamente diferentes de Glu 10µM; $p < 0.05$. **C.** “Immunoblotting” representativo do imunoconteúdo da ERK1/2.

3.6.2 -Análise da fosforilação da p38^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens incubadas com glutamato e GMP

A p38^{MAPK} é uma proteína quinase que pode ser ativada por diversos estímulos extracelulares (HARPER et al., 2001; LEAL et al., 2002). Com relação a modulação da p38^{MAPK} e excitotoxicidade, KAWASAKI e colaboradores (1997) demonstraram a ativação da p38^{MAPK} em neurônios granulares tratados com glutamato.

Foi analisada a modulação da p38^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos jovens incubadas por 1 hora na presença de GMP 1mM, glutamato 10 µM, 1 mM e 10 mM, na presença de GMP, e submetidas a 6 horas adicionais de incubação em meio de cultura.

A Figura 20 A mostra os “imunoblottings” da fosforilação da p38^{MAPK} e a quantificação das bandas é mostrada na Figura 20 B. A fosforilação da p38^{MAPK} foi expressa em porcentagem do controle. Pode-se observar uma tendência, porém não significativa, no aumento da fosforilação da p38^{MAPK} quando as fatias foram incubadas com glutamato 10 µM. Diferentemente, o aumento da concentração de glutamato para 10 mM promoveu diminuição da fosforilação da p38^{MAPK} em relação ao glutamato 10 µM. GMP não altera o efeito modulatório do glutamato sob a diminuição da fosforilação p38^{MAPK}.

Glutamato e GMP não alteram o imunoconteúdo p38^{MAPK} em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 20 C).

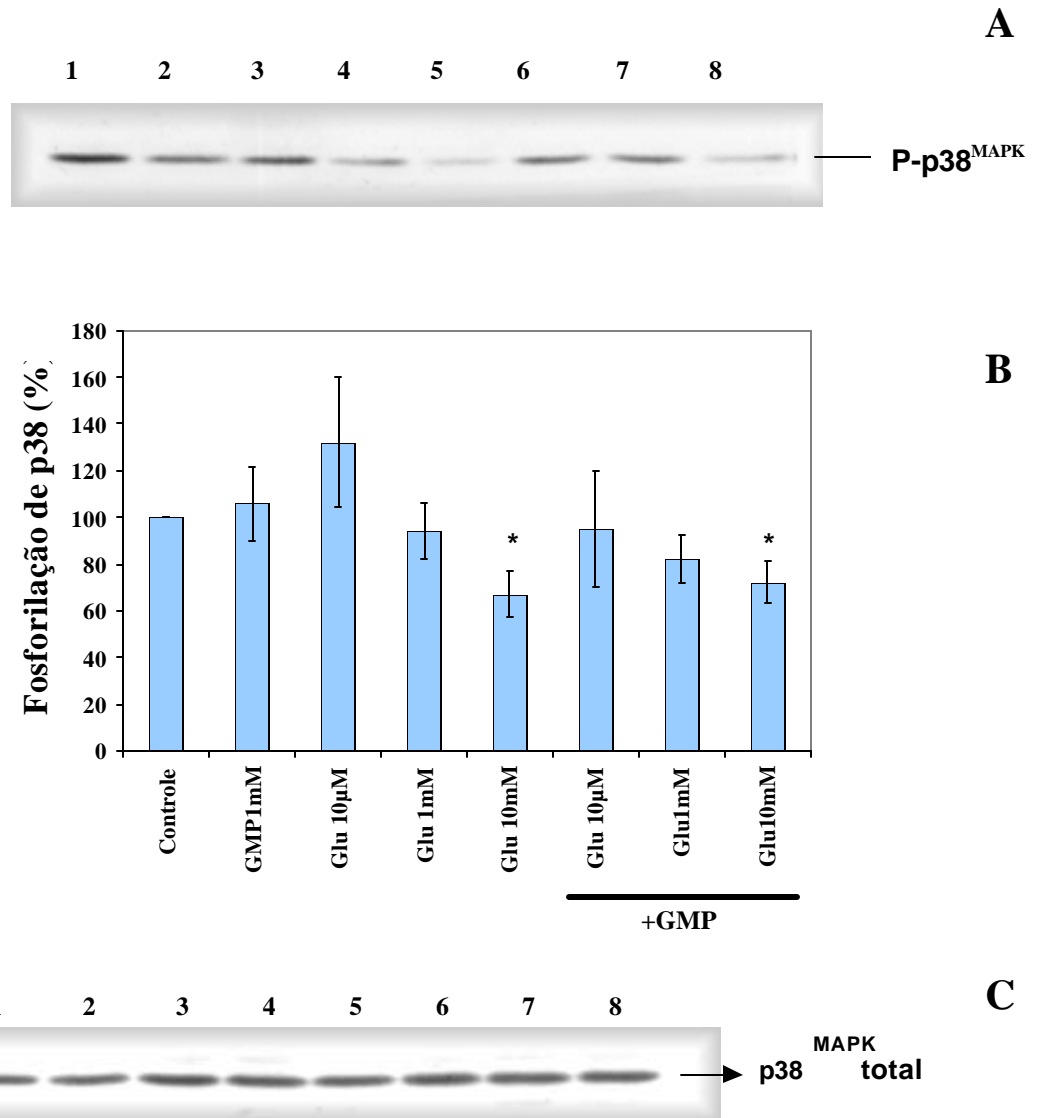


Figura 20. Avaliação da fosforilação da p38^{MAPK} em fatias de hipocampo tratadas com glutamato e GMP 1 mM: As fatias de hipocampo foram incubadas por 1 hora com Glu 10 μ M, 1 mM e 10 mM, na presença ou ausência de GMP 1 mM, e posteriormente incubadas por 6 h em meio de cultura. **A.** “Immunoblotting” representativo da fosforilação da p38^{MAPK}. Controle (coluna 1); GMP 1 mM (coluna 2); Glu 10 μ M (coluna 3); Glu 1 mM (coluna 4); Glu 10 mM (coluna 5); Glu 10 μ M + GMP (coluna 6); Glu 1 mM + GMP (coluna 7), Glu 10 mM + GMP (coluna 8). **B.** Análise por densitometria da fosforilação da p38^{MAPK}. Os valores representam a média \pm erro padrão de 8 experimentos realizados em triplicatas.* indica as médias significativamente diferentes de Glu 10 μ M; $p < 0.05$. **C.** “Immunoblotting” representativo do imunoconteúdo da p38^{MAPK}.

4-DISSCUSSÃO

A ativação de receptores para glutamato tem sido demonstrada em inúmeros processos fisiológicos no SNC e periférico. Por outro lado, também foi demonstrado que glutamato pode induzir excitotoxicidade em células neuronais e gliais (CHEN et al., 2000; MATUTE et al., 2002). A morte celular desencadeada por glutamato no SNC está envolvida na gênese de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas, em alterações cognitivas e no envelhecimento celular (MICHAELIS et al., 1997, MELDRUM, 2000; SEGOVIA et al., 2000). Dependendo do tipo de célula e da concentração de glutamato utilizada, foi demonstrado que glutamato pode induzir morte celular com características de necrose e/ou apoptose (CHOI, 1987, ANKARCRONA et al., 1995; ANKARCRONA et al., 1998, CHEUNG et al., 1998) . No entanto, tão importante quanto o estudo do mecanismo envolvido na toxicidade glutamatérgica, é o estudo de compostos que possam interagir com este sistema e dessa forma prevenir ou limitar os efeitos tóxicos do glutamato.

Neste estudo, demonstrou-se que glutamato promove morte celular com características apoptóticas. Glutamato induziu redução de viabilidade celular com ausência de permeabilização da membrana, indução de liberação do citocromo c da mitocôndria e fragmentação de DNA em oligonucleossomas (“DNA laddering”). GMP não alterou a diminuição de viabilidade celular induzida por glutamato, porém promoveu aumento da fragmentação de DNA. Além disto, o aumento da sua concentração de 1 para 5 mM promoveu diminuição na viabilidade das fatias hipocâmpais. Portanto, demonstrou-se a potencialidade do GMP como agente indutor de apoptose em fatias de hipocampo de ratos.

Os experimentos realizados para a padronização do modelo de injúria glutamatérgica, demonstraram que as fatias hipocâmpais mantiveram-se viáveis por um período de incubação de até 6 horas em meio de cultura (Figs. 2, 3 e 4). A incubação das fatias com glutamato por 3 horas em tampão KRB e 3 horas em meio de cultura, demonstrou perda significativa da viabilidade celular em todas as concentrações de glutamato (Fig. 5), sem aumento na liberação de LDH (Fig. 6). Portanto, ocorreu perda de viabilidade celular dependente de tempo de incubação e independente da concentração de glutamato. Por outro lado, quando as fatias permaneceram durante as 6 horas de incubação com glutamato em meio de cultura, glutamato 10 μM não promoveu perda de viabilidade celular (Fig. 7). Isto indica que a manutenção das fatias durante todo o período de incubação em meio de cultura, as torna mais resistentes à perda da viabilidade celular induzida por glutamato. A manutenção de fatias cerebrais em cultura por períodos mais prolongados (culturas organotípicas) também é realizada utilizando-se meio de cultura, substrato que fornece melhores condições para o metabolismo celular (GÄHWILER et al., 1997). Apesar de neste estudo utilizar-se um curto período de incubação das fatias hipocâmpais, quando comparado às culturas organotípicas, a manutenção da sua integridade celular também necessita da suplementação com meio de cultura.

Os resultados contraditórios obtidos na presença de glutamato 10 μM , esclareceram-se através da utilização de um protocolo em que as fatias foram submetidas por 1 hora a glutamato e posteriormente mantidas por 6 horas adicionais em meio de cultura. Neste modelo, glutamato 10 μM não promoveu perda de viabilidade celular, resultado reprodutível em todos os experimentos posteriores e consistente com o papel fisiológico do glutamato como importante neurotransmissor excitatório no SNC (MELDRUM, 2000).

Glutamato 1 mM e 10 mM, ocasionaram perda de viabilidade celular sem aumento na liberação de LDH, independentemente do modelo de incubação (Figs.7, 8, 9 e 10), demonstrando que a perda de viabilidade celular é dependente da concentração de glutamato. A ausência de toxicidade de glutamato 10 μ M pode ser explicada pela existência de carreadores de alta afinidade para glutamato nas células gliais, que contribuem efetivamente para a retirada do excesso de glutamato da fenda sináptica (DANBOLT, 2001). Consequentemente, apenas concentrações mais elevadas de glutamato causaram perda significativa da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos.

Vários estudos demonstram a interação dos derivados da guanina (DG) com o sistema glutamatérgico (SOUZA & RAMÍREZ, 1991; PAZ et al., 1994; TASCA et al., 1995; PAAS et al., 1996; DEV et al., 1996; TASCA et al., 1998; TASCA et al., 1999b). Estudos recentes realizados em nosso laboratório demonstraram proteção do GMP frente à neurotoxicidade induzida por glutamato em um modelo de isquemia química (MOLZ et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002). Neste trabalho, não observou-se efeito neuroprotetor do GMP (Fig. 11) e também não foi observado efeito do GMP quando este era pré-incubado ou mantido durante as 6 horas adicionais de incubação (dados não mostrados). Este resultado contrasta com os previamente encontrados na literatura. No entanto, estudos demonstrando o efeito dos DG antagonizando a transmissão glutamatérgica utilizaram modelos de exposição aguda ao glutamato e aos DG. Nos estudos *in vitro*, os DG inibiram respostas celulares induzidas pela ativação de receptores metabotrópicos (TASCA et al., 1995, TASCA et al., 1998), assim como a toxicidade induzida por glutamato (MOLZ et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002); e *in vivo*, inibiram convulsões induzidas pela injeção de ácido quinolínico (SCHIMIT et al., 2000; LARA et al., 2002). MALCON e colaboradores (1997), demonstraram que GMP previne a perda de células estriatais induzida pela

injeção de ácido quinolínico. A avaliação histológica foi realizada seis semanas após a indução do dano, no entanto, não foi discriminada o tipo de morte celular envolvida neste dano.

Por outro lado, o efeito protetor de GMP na presença de NMDA, confirma os relatos prévios apontando os derivados da guanina como neuroprotetores (Fig. 13). A ausência de neuroproteção do GMP no dano induzido pelo agonista endógeno glutamato, pode sugerir que o glutamato não esteja agindo somente via seus receptores específicos. Já foi demonstrado que glutamato pode ter ação gliotóxica através da inibição da captação de cisteína por seus carreadores gliais antiporter glutamato/cisteína, levando à diminuição da síntese de glutathione e indução de estresse oxidativo (YASUI et al., 1996; CHEN et al, 2000). Portanto, considerando que glutamato também pode interagir com seus carreadores gliais, além de seus receptores específicos, e que nas fatias hipocâmpais estamos diante de uma população heterogênea de subtipos celulares, podemos sugerir que a indução de toxicidade por glutamato possa estar ocorrendo não só via ativação de receptores, os quais poderiam ser bloqueados por derivados da guanina, mas também via interferência nos transportadores de glutamato. A utilização de H_2O_2 como controle positivo para indução de apoptose via estresse oxidativo (SATO et al., 1998; ISHIKAWA et al., 1999), e a observação de efeitos similares aos obtidos com glutamato em relação à diminuição de viabilidade celular, indica que é possível que o mecanismo de toxicidade glutamatérgica que estamos observando envolva estresse oxidativo.

A tentativa de aumentar a concentração de GMP para 5 mM também não promoveu neuroproteção contra o dano glutamatérgico, além disto, GMP 5mM promoveu redução na viabilidade celular nas fatias hipocâmpais (Fig. 12).

O glutamato pode exercer suas ações através da interação com receptores ionotrópicos e metabotrópicos (MICHAELIS, 1997; DANBOLT, 2001). Constatou-se o envolvimento de receptores ionotrópicos na perda da viabilidade celular induzida por glutamato

1 mM (Fig. 14), e de receptores ionotrópicos e metabotrópicos na toxicidade induzida por glutamato 10 mM (Figs. 14 e 15). O mecanismo primário da morte celular induzida por glutamato envolve o desequilíbrio iônico promovido pela entrada excessiva de cálcio, inicialmente por atuar via seus receptores ionotrópicos (KA, AMPA e NMDA) e posteriormente atuando também via seus receptores metabotrópicos (MICHAELIS, 1998). O aumento na concentração de glutamato de 1 para 10 mM, disponibiliza um maior número de moléculas para interagir via receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Isto poderia explicar o motivo pelo qual um antagonista metabotrópico não reverteu a perda da viabilidade celular promovida por glutamato 1 mM, mas apresentou proteção parcial na redução da viabilidade induzida por glutamato 10 mM.

A morte celular induzida por glutamato pode ser tanto necrótica quanto apoptótica. Considerando que glutamato induziu injúria celular, sem permeabilização da membrana plasmática em fatias hipocâmpais, avaliou-se o envolvimento de eventos que ocorrem na apoptose para caracterizar o tipo de morte celular promovida por glutamato.

A análise temporal dos eventos que ocorrem durante a apoptose, demonstra que a liberação do citocromo c precede a ativação de caspases e a fragmentação de DNA (SASTRY & RAO, 2000; MATTSON, 2000; GARRIDO et al., 2001). Em um modelo de indução de hipóxia em fatias cerebrais, foi observada liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol das células cerca de 1,5 horas após o insulto, seguido da ativação da caspase-9 e a fragmentação de DNA (HIRAI et al., 2002). Nossos resultados também demonstraram que a liberação do citocromo c precede a fragmentação de DNA em fatias hipocâmpais incubadas com glutamato 1 e 10 mM. Glutamato 10 μ M induziu fragmentação de DNA, no entanto, não foi observada liberação do citocromo c. Sugere-se que nesta concentração, glutamato promova liberação do

citocromo c em períodos anteriores ou posteriores ao analisado neste estudo. Alternativamente, glutamato 10 μ M poderia estar promovendo fragmentação do DNA através da ativação da via apoptótica extrínseca (KORNBLUTH, 2001). Como nossos resultados demonstrando liberação de citocromo c por glutamato ainda são avaliações preliminares, uma avaliação temporal mais detalhada da liberação do citocromo c fornecerá subsídios para uma melhor compreensão deste processo. A indução de liberação de citocromo c, associada à perda de viabilidade, sem permeabilização da membrana celular, indicam que glutamato induz apoptose em fatias de hipocampo de ratos.

Considerando que um dos objetivos deste trabalho foi estudar o possível papel neuroprotetor do GMP na morte celular induzida por glutamato, verificou-se a interação do GMP na fragmentação de DNA promovida por glutamato. GMP 1 mM não diminuiu a fragmentação de DNA induzida por glutamato. Ao contrário, constatou-se que GMP sozinho induz fragmentação de DNA e que GMP age no sentido de aumentar a fragmentação de DNA promovida por glutamato. Estes resultados observados com a utilização de GMP corroboram os resultados previamente apresentados quando GMP (5mM) promoveu perda significativa da viabilidade celular (Fig. 13).

Já foi observado que ADO pode induzir morte celular por apoptose em células astrogiais (ABRACCHIO et al., 1995) e em cultura de neuroblastomas (SCHRIER et al., 2002). A GUO por sua vez, estimula a liberação de ADO em astrócitos e dessa maneira, pode ser responsável por alguns efeitos da GUO (CICCARELLI et al., 2000). Sob condições de hipóxia/isquemia, as células astrocitárias podem liberar até três vezes mais GUO que em condições normais, e a concentração desta purina pode permanecer elevada por até 30 minutos (CICCARELLI et al., 1999). Em um estudo recente, DI IORIO e colaboradores (2002),

demonstraram que a adição de GUO às culturas de astrócitos induz liberação de ADO. Esta por sua vez, agindo em seus receptores A_3 , causa apoptose em células astrocitárias. No nosso modelo de estudo, não se pode descartar a possibilidade de hidrólise extracelular do GMP e formação de GUO pela ação de 5'-ectonucleotidases (ZIMMERMANN, 1994; BOECK et al., 2000). Logo, o efeito do GMP pode ser devido a sua degradação e formação GUO, interação com o sistema purinérgico via ativação de receptores para ADO e indução de apoptose.

Em uma tentativa de identificar as vias de sinalização celular envolvidas na morte celular induzida por glutamato em fatias de hipocampo de ratos, determinou-se a fosforilação de MAPK (ERK 1/2 e $p38^{MAPK}$). As MAPKs são proteínas quinases ativadas pela dupla fosforilação em resíduos específicos de tirosina e treonina (COOB & GOLDSMITH, 1995). Os anticorpos usados nesse trabalho reconhecem apenas a forma fosforilada (ativada) destas enzimas.

De maneira geral, considera-se que a ativação de ERK 1/2 é importante na indução de fatores de transcrição envolvidos em processos anti-apoptóticos e na sobrevivência celular, enquanto que a sinalização via ativação da $p38^{MAPK}$ e JNK induzem apoptose (BONNI et al., 1999; HARPER & LOGRASSO, 2001; CHANG & KARIN, 2001). Estudos *in vitro* utilizando culturas de células expostas ao glutamato, demonstraram ativação da ERK 1/2 (JIANG et al., 2000; GRANT et al., 2001; GIARDINA et al., 2002) e $p38^{MAPK}$ (KAWASAKI et al., 1997; MUKHERJEE et al., 1999) e indução de toxicidade. Por outro lado estudos utilizando modelos de isquemia *in vivo*, demonstraram a ativação da via da ERK1/2 e $p38^{MAPK}$ em regiões onde as células sobrevivem ao insulto isquêmico (PARSONS et al., 2000). JIN e colaboradores, (2002), também demonstraram que a ativação da ERK1/2 inibe apoptose em culturas submetidas à isquemia, através da fosforilação e inativação da Bax. A correlação entre a redução de viabilidade celular e diminuição da fosforilação da ERK 2 e $p38^{MAPK}$ demonstrada neste estudo, apontam

inicialmente para o envolvimento da inibição destas vias de sinalização celular na toxicidade glutamatérgica (Fig. 19). No entanto, devemos considerar que, apesar de glutamato induzir morte celular com características apoptóticas, a redução de viabilidade poderia ocasionar a depleção dos níveis de ATP, necessários para a fosforilação destas quinases. GMP não alterou a modulação das vias da ERK 1/2 e p38^{MAPK} induzida por glutamato, semelhante ao observado em relação à redução de viabilidade celular das fatias hipocampais.

Apesar de ERK 1/2 e p38^{MAPK} terem sido inicialmente identificadas como quinases ativadas por diferentes estímulos extracelulares, crescentes evidências apontam para a intercomunicação entre as duas vias. A ativação da ERK 1/2 e p38^{MAPK} induzem a ativação dos mesmos fatores de transcrição (CREB e Elk-1) (TRAVERSE et al., 1992; CAHILL et al., 1996; JANKNECHT et al., 1997) e alguns estímulos podem ativar a via da ERK 1/2 através da ativação da via da p38^{MAPK} (LUDWIG et al., 1998). Adicionalmente, as vias das ERK 1/2 e p38^{MAPK} podem fosforilar substratos comuns (DEAK, 1998).

Diante do que foi exposto, a dicotomização dos efeitos das MAPKs parece ser apenas uma simplificação, considerando a complexidade das vias de transdução de sinal envolvendo as MAPKs e o fato de que a ativação destas vias pode induzir diferentes respostas dependendo do estímulo e do tipo celular avaliado. A investigação do envolvimento da via das ERK e p38^{MAPK} em modelos celulares que mantém a citoarquitetura celular e consequentemente as interações entre os diferentes tipos de células apresenta uma nova perspectiva na elucidação da comunicação entre as MAPKs e o seu envolvimento em sobrevida e/ou dano celular. Neste sentido, a utilização de inibidores ou ativadores da via da ERK 1/2 e da p38^{MAPK} se mostra uma ferramenta importante na elucidação da participação destas vias na morte ou sobrevivência celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à excitotoxicidade.

Acrescentando-se o que foi exposto neste trabalho às informações presentes na literatura, pode-se sugerir que a presença dos DG no espaço extracelular pode contribuir para a recuperação de células lesadas através de seus efeitos tróficos e/ou via interação com os receptores e/ou carreadores glutamatérgicos. Por outro lado, os DG também podem contribuir, através da apoptose, para a retirada de células danificadas. Desta maneira, os DG podem agir de maneira integrada em diversas respostas celulares numa tentativa de restabelecer a homeostasia celular durante insultos envolvendo o SNC.

5 - CONCLUSÕES

- Glutamato 1 e 10 mM promoveram redução significativa da viabilidade celular sem comprometimento da integridade da membrana plasmática, em fatias de hipocampo de ratos. Esta redução de viabilidade celular é acompanhada por liberação do citocromo c da mitocôndria e fragmentação do DNA em frações internucleossomais, sugerindo que nestas concentrações glutamato promova morte celular por apoptose.
- Glutamato 10 μ M não promoveu alterações na viabilidade celular e na permeabilidade da membrana plasmática e também não induziu liberação do citocromo c da mitocôndria, porém, promoveu fragmentação de DNA em frações internucleossomais.
- Glutamato 10 μ M não alterou a fosforilação das MAPKs, ERK 1/2 e p38^{MAPK}, no entanto, Glutamato 1 e 10 mM, promoveram inibição da ERK 2 e p38^{MAPK} em fatias de hipocampo de ratos.
- A perda de viabilidade celular induzida por glutamato 1 mM ocorreu através da ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, enquanto que glutamato 10 mM reduziu a viabilidade celular via ativação de receptores ionotrópicos e metabotrópicos.
- GMP 1 mM não alterou a redução de viabilidade celular induzida por glutamato (1 e 10 mM) e não teve efeito sobre a modulação da ERK 2 e p38^{MAPK} induzida por glutamato. Contudo, protegeu contra a perda de viabilidade celular induzida pela ativação de receptores NMDA,

sugerindo que a redução de viabilidade celular promovida por glutamato pode envolver outros mecanismos além da ativação de seus receptores.

- GMP 1 mM induziu fragmentação de DNA e aumentou o grau de fragmentação de DNA promovido por glutamato. O aumento da concentração de GMP de 1 para 5 mM reduziu a viabilidade celular. Estes resultados apontam o GMP como um potencial agente indutor de apoptose.

6 - PERSPECTIVAS

- Verificar se a morte celular apoptótica induzida por glutamato e GMP em fatias de hipocampo de ratos é bloqueada por antagonistas glutamatérgicos e purinérgicos.
- Verificar o envolvimento da modulação das vias das ERK 1/2 e p38^{MAPK} na morte celular apoptótica em fatias de hipocampo de ratos, através da utilização de inibidores e/ou ativadores destas vias.
- Comparar a morte celular por apoptose induzida por glutamato em fatias de hipocampo de ratos com outros modelos de organização celular, através da utilização de culturas de células neuronais, astrocitárias e co-cultura destes dois tipos celulares (provenientes do hipocampo de ratos).
- Nestes distintos tipos celulares, avaliar as diferenças de ativação de subtipos de receptores glutamatérgicos, diferenças temporais na indução dos mecanismos moleculares envolvidos na morte por apoptose e possíveis diferenças nas vias de sinalização celular.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. **Jpn. J. Pharmacol.** v.78, p. 114-143, 1998.
- ABRACCHIO, M.P.; CERUTI, S.; BARBIERI, D.; FRANCESCHI, C.; MALONI, W.; BIONDO, L.; BURNSTOCK, G.; CATTABENI, F. A novel action for adenosine: apoptosis of astroglial cells in rat primary cultures. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v.213, p. 908-915, 1995.
- ANKARCRONA, M. Glutamate induced cell death: apoptosis or necrosis? **Progr. Brain Res.** v.116, p.266-272, 1998.
- ANKARCRONA, M.; DYPBURKT, J.M.; BONFOCO, E.; ZHYVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, S.A.; NICOTERA, P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron.** v.15, p.961-973, 1995.
- BALDO, B.A. Protein blotting: research, applications and its place in protein separation methodology In: **Advances in Electrophoresis**, ed. by A. Chranbach, M.D. Dunn and B.J. Radola, 1994, v.7, p.407-478, VCH.
- BLEAKMAN, D. & LODGE, D. Neuropharmacology of AMPA and Kainate receptors. **Neuropharmacol.** v.37, p.1187-1204, 1998.
- BOECK, C.R.; BRONZATO, M.J.; SOUZA, D.O.; SARKIS, J.J.; VENDITE, D. The modulation of ecto-nucleotide activities by glutamate in cultured cerebellar granule cells. **Neuropharmacol. Neurotoxicol.** v.11, p. 1-4, 2000.
- BONNI, A; BRUNET, A. WEST, A. E.; DATTA, S.R.; TAKASU, M.A. GREENBERG, M.E. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and – independent mechanisms. **Science.** v.286, p.1358-1362, 1999.
- BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A.; McCORMICK, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. **Nature.** v.348, p.125-131, 1990.
- BUNN, S.J.; SIM, A.T.R.; HERD, L.M.; AUSTIN, L.M.; DUNKLEY, P.R.. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of intracellular calcium in the Ser⁸, Ser¹⁹, Ser³¹ and Ser⁴⁰. **J. Neurochem** v. 64, p.1370-1378, 1995.
- BURNSTOCK, G. Distribution and role of purinoreceptors subtypes. **Nucleos. Nucleotid.** v.70, p.917-930, 1991.
- BUTLER, T.L; KASSED, C.A.; PENNYPACKER, K.R. Signal transduction and neurosurvival in experimental models of brain injury. **Brain Res. Bulletin.** v.59, p.339-351, 2003.

- CAHILL, M.A.; JANKNECHT, A.; NORDHEIM, A. Signalling pathways: jack of all cascades. **Curr. Biol.** v.6, p. 16-19, 1996.
- CHANG L. & KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature.** v.410, p.37-40, 2001.
- CHEN, C-J.; LIAO, S-L.; KUO, J-S. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. **J. Neurochem.** v.75, p.1557-1565.
- CHEN, T.A. YANG, F.; COLE, G.M. CHAN, S.O. Inhibition of caspase-3-like activity reduces glutamate induced cell death in the adult retina. **Brain Res.** v.1, p.1-12, 2001.
- CHOI, D.W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. **J. Neurosci.** v.7, p. 369-379.
- CICCARELLI, R.; IORIO P.; GIULIANI, P.; D'ALIMONTE, I.; BALLERINI, P.; CACIAGLI, F.; RATHBONE, M. P. Rat Cultured Astrocytes Release Guanine-Based Purines in Basal Conditions and After Hypoxia/Hypoglycemia. **Glia.** v.2, p.93-98, 1999.
- CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; D'ALMONTE, I.; GIULIANI, P.; FLORIO, T.; CACIAGLI, F.; MIDDLEMISS, P.J.; RATHBONE, M.P. Cultured astrocytes proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. **Glia.** v.29, p. 202-211, 2000.
- CICCARELLI, R.; BALLERINI, P.; SBATINO, G.; RATHBONE, M.P.; D'ONOFRIO, M.; CACIAGLI, F.; DI IORIO, P. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. **Int. J. Dev. Neurosci.** v.19, p.395-414, 2001.
- COBB, M.H. & GOLDSMITH, E.J. How the Map kinases are regulated. **J. Biol. Chem.** v.270, p. 14843-14846, 1995.
- COLLINGRIDGE, G. L.; & LESTER, R. A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacol. Rev.** v.40, p.144-209, 1989.
- COLLINS, E. & SIM, A.T.R. Regulation of neuronal PP1 and PP2 during development Methods. **Mol. Biol.** v.38, p.21-43, 1998.
- COOPER, J. R.; BLOOM, F. E. & ROTH, R. H. Amino acid transmitters. In: **The Biochemical Basis of Neuropharmacology.** p.126-193. Oxford University Press, New York, 1996.
- CROSTHWAITE, A.J.; HASAN, S.; WILLIAMS, R.J. Hydrogen peroxide-mediated phosphorylation of ERK1/2, Akt/PKB and JNK in cortical neurones: dependence on Ca^{2+} and PI3-kinase. **J. Neurochem.** v.80, p.24-35, 2002.
- DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progr. Neurobiol.** v.65, p.1-105, 2001.

- DAVID, J.C.; YAMADA, K.A.; BAWGE, M.R; GOLDBERG, M.P. AMPA receptor activation is rapidly toxic to cortical astrocytes when desensitization is blocked. **J. Neurosci.** v.16, p.200-209, 1996.
- DEAK, M.; CLIFTON, A.D.; LUCOCQ, L.M.; ALESSI, D.R.; Mitogen and stress activated protein kinase-1 MSK1 is directly activated by MAP and SAPK3/p38, and may mediate activation of CREB. **EMBO J.** v.17, p.4426-4441, 1998.
- DEV, K. K.; ROBERTS, P. J.; HENLEY J. M. Characterisation of the Interaction Between Guanyl Nucleotides and AMPA Receptors in Rat Brain. **Neuropharmacol.** v.35, p.1583-1593, 1996.
- DI IORIO, P. CICCARELLI, R., TRAVERSA, U.; ANDREW, C.M.; CROCKER, C.E.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.P. Mechanism of purine nucleosides induced apoptosis in astrocytes. **Glia.** v.38, p. 179-190, 2002.
- DUVOISIN, R. M.; ZHANG, C.; RAMONELL, K. A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. **J. Neurosci.** v.15, p.3075-3080, 1995.
- EXTON, J.H. Small GTPases minireview series. **J. Biol. Chem.** v.273, p.199923, 1998.
- FALCIERI, E.; MARTELLI, A.M.; BAREGGI, R.; CATALDI, A.; COCCO, L. Thir protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 without concomitant DNA fragmentation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 193, p. 19-25 ano.
- FONNUM, F. Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool. **Prog. Biophys. Mol. Biol.** v.60, p.47-57, 1993.
- FRIZZO, M. E. S.; LARA D. R.; DAHM, K. C. S.; PROKOPIUK, A. S.; SWANSON R.; SOUZA, D. O. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. **NeuroReport.** v.12, p.1-3, 2001.
- FUKUDA, K.; KOJIRO, M.; CHIU, J.F.. Demonstration of extensive chromatin cleavage in transplanted Morris hepatoma 7777 tissue: apoptosis or necrosis? **Am. J. Phatol.** v.142, p.936-946, 1993.
- GÄHWILER, B.H.; CAPOGNA, M.; DEBANNE, D.; McKINNEY, R.A., THOMPSON, S M. Organotypic slices cultures: A technique has come of age. **Trends Neurosci.** v.20, p.471-477, 1997.
- GARRIDO, R.; MATTSON, M.; HENNIG, B.; TOBOREK, M. Nicotine protects against arachidonic-acid-induced caspase activation, cytochrome c release and apoptosis of cultured spinal cord neurons. **J. Neurochem** v.76, p. 1395-1403, 2001.
- GASIC, G.P. & HOLLMAN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. **Annu. Rev. Physiol.** v.54, p.507-536, 1994.

- GIARDINA, S.F. & BEART, P.M. kainate receptor-mediated apoptosis in primary culture of cerebellar granule cells is attenuated by mitogen-activated protein and cyclin-dependent kinase inhibitors. **British J. Pharmacol.** v.135, p. 1733-1742, 2002.
- GOTTLIEB, M.; MATUTE, C. Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cells of the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia. **J. CERB. Blood Flow Metab.** v.17, p.290-300, 1997.
- GRANT, E.R.; ERRICO, M.A.; EMANUEL, S.L.; BENJAMIN, D.; McMILLIAN, M.K.; WADSWORTH, S.A.; ZIVIN, R.A.; ZHONG, Z. Protection against glutamate toxicity through inhibition of the p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway in neuronally differentiated P19 cells. **Biochemical Pharmacology.** v.62, p.283-296, 2001.
- GYSBERS, J.W. & RATHBONE, M.P. Guanosine enhances NGF-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells. **Neuroreport.** v.3, p.997-1000, 1992.
- GYSBERS, J.W. & RATHBONE, M.P. Neurite outgrowth from PC12 cells is enhanced by guanosine through both cAMP-dependent and -independent mechanisms. **Int. J. Dev. Neurosci.** v.41, p.19-34, 2000.
- HARPER, S.J. & LOGRASSO, P. Signalling for survival and death in neurones – The role of stress-activated kinases, JNK and p38. **Cell. Signal.** v.13, p.199-310, 2001.
- HEADLEY, P. M.; GRILLNER, S. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. **Trends Pharmacol. Sci.** v.11, p.205-211, 1990.
- HEPLER, J. R.; & GILMAN, A.G. G Proteins. **Trends Biochem. Sci.** v.17, p.383-387, 1992.
- HIRAI, K.; SUGAWARA, T.; CHAN, P.K.; BASUS, V.J.; JAMES, T.L.; LITT, L. Cytochrome c associated apoptosis during ATP recovery after hypoxia in neonatal rat cerebrocortical slices. **J. Neurochem.** v.83, p.309-319, 2002.
- HIRASHIMA, Y.; KURIMOTO, M.; NOGAMI, K.; ENDO, S.; SAIOTH, M.; OHTANI, O.; NAGATA, T.; MURAGUCHI, A.; TAKAKU, A. Correlation of glutamate-induced apoptosis with caspase activities in cultured rat cortical neurons. **Brain Res.** v.849, p.109-118, 1999.
- HUTTERMANN, E., UKENA D., LESCHOW, V., SCHWABE, U. Adenosine receptors in human platelets. Characterization by 5'-N-ethylcarboxamino- [H^3]-adenosine binding in relation to adenylate cyclase activity. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** v.325, p. 226-233.
- IENTILE, R. ; MACAIONE, V.; TELETTA, M.; TORRE, V.; MACAIONE, S. Apoptosis and necrosis occurring in excitotoxic cell death in isolated chick embryo retina. **J. Neurochem.** v. 79, p. 71-78, 2001.

- IRVING, E.A.; BARONE, F.C.; REITH, A.D., HADINGHAM, A; PARSONS, A.A. Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischemia in the rat. **Molec. Brain Res.** v.77, p.65-75, 2000.
- ISAACSON, J. S. & NICOLL, R. A. The uptake inhibitor L-trans-PDC enhances responses to glutamate but fails to alter the kinetics of excitatory synaptic currents in the hippocampus. **J. Neurophysiol.** v.70, p.2187-2191, 1993.
- ISHIKAWA, Y.; SATOH, ENOKIDO, Y.; NISHIO, C.; IKEUCHI, T.; HATANAKA, H. Generation of reactive oxygen species, release of L-glutamate and activation of caspases are required for oxygen-induced apoptosis of embryonic hippocampal neurones in culture. **Brain Res.** v.824, p 71-80, 1999.
- ISHIMARU, M.J.; IKONOMIDOU, C.; TENKOVA, T.I.; DER, T.C.; DIKRANIAN, K.; SESMA, M.A; OLNEY, J.W. Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing brain. **J. Comparat. Neurol.** v.408, p.461-476, 1999.
- JACOBSON, M. Bcl-2 related proteins get connected. **Current Biology.** v.7, p.277-281, 1997.
- JANKNECHT, R.; HUNTER, T.; Convergence of MAP kinase pathway on the ternary complex factor Sap-1a. **EMBO J.** v.16, p. 1620-1627, 1997.
- JIANG, Q.; ZHENGLIN, G.; ZHANG, G.; GUOZHANG, J. Diphosphorylation and involvement of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in glutamate-induced apoptotic-like death in cultured rat cortical neurons. **Brain Res.** v.887, p.285-292, 2000.
- JIN, K.; MAO, X.O.; ZHU, Y.; GREENBERG, D.A. MEK and ERK protect hypoxic cortical neurons via phosphorylation of Bad. **International Society for Neurochemistry.** v.80, p. 119-225, 2002.
- JOHNSTON, M. V. Neurotransmitters and vulnerability of the developing brain. **Brain Res.** v.17, p.301-306, 1995.
- KANDEL, E.; SCHWARTZ, J. & JESSEL, T. **Principles of Neural Science.** Elsevier, 1991.
- KAWASAKI, H.; MOROOKA, T.; SHIMOHAMA, S.; KIMURA, J.; HIRANA, T.; GOTOH, Y.; NISHIDA, E. Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. **J. Biol. Chem.** v.272, p.18518-18521, 1997.
- KERR, J.R.F.; WYLIE, A.H.; CURRIE, A.R.; Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.** v.26, p.239-257, 1972.
- KOMURO, H.; RAKIC, P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. **Science.** v.260, p. 95-97, 1993.

- KUAN, C.Y.; ROTH, K.A.; FLAVELL, R.A.; PASKO, R. Mechanism of programmed cell death in the developing brain. **Trends Neurosci.** v.23, p.291-297, 2000.
- LaMANTIA, A. S. The usual suspects: GABA and glutamate may regulate proliferation in the neocortex. **Neuron** v.15, p.1223-1225, 1995.
- LARA, DR; SCHIMIDT,AP; FRIZZO, MES; JAVIER, SB; GALO, R; SOUZA,DO. **Brain Res.** v.912, p.176-180, 2001.
- LEAL, R.B.; CORDOVA, F.M.; LYNN, H.; DUNKLEY, P.R. Lead-stimulate p38^{MAPK} – dependent Hsp27 phosphorylation. **Toxicology and Applied Pharmacology.** v.178, p.44-51, 2002.
- LEIST, M.; SINGLE, B.; NAUMANN, H.; FAVA, E.; SIMON, B.; KÜHNLE, S.; NICOTERA, P. Nitric oxide inhibits execution of apoptosis at two distinct ATP-dependent and downstream of mitochondrial cytochrome c release. **Biochem Biophys. Res. Comm.** v.258, p.215-221, 1999.
- LIPTON S. A., & ROSENBERG P. A. Mechanisms of disease. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. **The New Eng. J. Med.** v.330, p.613-622, 1994.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v.193, p.265-275, 1951.
- LUCAS, R.D. & NEWHOUSE J.P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. **AMA Arch. Ophthalmol.** v.58, p.193-201, 1957.
- LUDWIG, S.; HOFFMEYER, M.; GOEBELER, K.; HÄFNER, B.; NEUFELD, B.; HAN, J.; RAPPS, U.R. The stress inducer arsenite activates mitogen-activated protein kinases extracellular regulated kinase 1 e 2 via a MAPK kinase 6/p38-dependent pathway. **J. Biol. Chem.** v.273, p. 1917-1922, 1998.
- MAILLY, F.; MARIN, P.; ISRAËL, M; GLOWINSKY J.; PRÉNOT, J. Increase in external glutamate and NMDA receptor activation contribute to H₂O₂-induced neuronal apoptosis. **J. Neurochem.** v.73, p. 1181-1188, 1999.
- MALCON, C.; ACHAVAL, M.; KOMLUS S.; PARTATA, W.; SAURESSIG, M.; RAMÍREZ, G.; SOUZA, D. O. GMP protects against quinolinic acid-induced loss of NADPH diaphorase-positive cells in the rat striatum. **Neurosci. Lett.** v.225, p.145-148, 1997.
- MATTSON, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.** v.1, p.120-129, 2000.
- MATUTE, C.; ALBERDI, E.; IBARRETXE, G.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, MV. Excitotoxicity in glial cells. **Eur. J. Pharmacol.** v.447, p.239-246, 2002.

- McDONALD, J. W. & JOHNSTON, M. V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acid during central nervous system development. **Brain Res. Rev.** v.15, p.41-70, 1990.
- MELDRUM, B.; & GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. **Trend Pharmacol. Sci.** v.11, p.54-62, 1990.
- MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J. Nutr.** v.130, p.1007S-1015S, 2000.
- MICHAELIS, E.K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Prog. Neurobiol.** v.54. p.369-415, 1998.
- MOLZ, S.; OLIVEIRA, I.J.L; SOUZA, D.O; TASCA, C.I. GMP prevents toxicity in hippocampal slices submitted to glutamate in a chemical model of ischemia. **J. Neurochem** 78 (suppl.1) v.196, Abstract BP23-33, 2001.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity. **J. Immunol. Methods** . v.65, p. 55-63, 1983.
- MUKHERJEE, P.K; DeCOSTER, M.A.; CAMPBELL, F.Z.; DAVIS, R.J.; BAZAN, N.G. Glutamate receptor signaling interplay modulates stress-sensitive mitogen-activated protein kinases and neuronal cell death. **The J. Biol. Chem.** v.274, p.6493-6498, 1999.
- NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* v.256, p.12-18, 2000.
- NAITO, S.; & UEDA, T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. **J. Neurochem.** v.44, p.99-109, 1985.
- OBRENOVITCH, T. P. & URENJAK, J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. **Progr.Neurobiol.** v.51, p.39-87, 1997.
- OCHU, E.E.; ROTHWELL, N.J.; WATERS, C.M. Caspases mediate 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. **J Neurochem.** v.70, p.2637-2640, 1998.
- OLIVEIRA, I.J.L; MOLZ, S.; SOUZA, D.O; TASCA, C.I. Neuroprotective effect of GMP in hippocampal slices submitted to an in vitro model of ischemia. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v.22, p.335-344, 2002.
- OLNEY, J. W. Kainic acid and other excitotoxins: a comparative analysis. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.** v.27, p.375-384, 1981.
- OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate.. **Science.** v.164, p.719-721, 1969.

- OLSON, M. & KORNBLUTH, S. Mitochondria in apoptosis and human disease. **Current Molecular Medicine**. v.1, p.91-122, 2001.
- OLSSON, R.A. & PEARSON, J.D. Cardiovascular purinoreceptors. **Physiol. Rev.** v.70, p.761-845, 1990.
- OTTERSEN, O. P.; STORM-MATHISEN, J. Neurons containing ou accumulating transmitter amino acids. In: BJÖRKLUND, A., HÖKFELT, T. KUCHAR, M. J. (Eds), Handbook of chemical neuroanatomy. In: **Classical Transmitters and transmitter Receptors in the CNS**. vol.3, Part II. Elsevier, Amsterdam, pp.141-246, 1984.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progr. Neurobiol.** v.55, p.581-618, 1998.
- PAAS, Y.; DEVILLERS-THIERY, A.; CHANGEUX, J.-P.; MEDEVIELLE, F.; TEICHBERG, V. I. Identification of an extracellular motif involved in the binding of guanine nucleotides by a glutamate receptor. **EMBO J.** v.15, p.1548-1556, 1996.
- PAZ, M. M.; RAMOS, M.; RAMÍREZ, G.; SOUZA, D. O. Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase activity in chick optic tectum. **FEBS Lett.** v.355, p.205-208, 1994.
- PEDATA, F.; LATINI, S.; PUGLIESE, A. M.; PEPEU, G. Investigations into the adenosine outflow from hippocampal slices evoked by ischemia-like conditions. **J. Neurochem** v.61, p.284-289, 1993.
- PELLICCIARI, R. & CONSTANTINO G. Metabotropic G-protein-coupled glutamate receptors as therapeutic targets. **Curr. Opinion Chem. Biol.** v.3, p.433-440, 1999.
- PERKINTON, M.S.; IP, J.K.; WOOD, G.L.; CROSTHWAITE, J.; WILLIAMS, R.J. Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), AKT/PKB and CREB in striatal neurons. **J. Neurochem** v.80, p.239-254, 2002.
- PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal. Biochem.** v. 83, p.346-356, 1977.
- PHILLIS, J. W.; SMITH-BARBOUR, M.; O'REGAN, M. H. Changes in extracellular amino acid neurotransmitters and purines during and following ischemias of different durations in the rat cerebral cortex. **Neurochem. Int.** v.29, p.115-120, 1996.
- PIN, J. P. & DUVOISIN, R. Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. **Neuropharmacol.** v.34, p.1-26, 1995.
- QIN, Z.H.; WANG, Y.; CHASE, T.N. Stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors induces apoptosis in rat brain. **Brain Res.** v.725, p.166-176, 1996.

- RATHBONE, M. P.; MIDDLEMISS P. J.; GYSBERS W. J.; ANDREW, C.; HERMAN, M. A. R.; REED J. K.; CICCARELLI, R.; IORIO, P. D.; CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progr. Neurobiol.** v.3, p.663-690, 1999.
- REGNER, A.; CRESTANA, R. E.; SILVEIRA-FILHO, J. P. J.; FRIEDAMN, G.; CHEMALE, I.; SOUZA, D. O. Guanine nucleotides are present in human CSF. **NeuroReport** v.8, p. 3771-3774, 1997.
- REGNER, A.; RAMÍRE, G.; BELLÓ-KLEIN, A.; SOUZA, D. O. Effects of Guanine nucleotides on Glutamate-Induced Chemiluminescence in rat Hippocampal Slices Submitted to Hypoxia. **Neurochem. Res.** v.23, p.523-528, 1998.
- ROBINSON, M. B.; & DOWD, L. A. Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. **Adv. Pharmacol.** v.37, p.69-115, 1997.
- ROSSI, D. J.; SLATER, N. T. The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. **Neuropharmacol.** v.32, p.1239-1248, 1993.
- RUBIN, M. A.; JURACH, A.; DA COSTA-JÚNIOR, E. M.; LIMA, T. T. F.; JIMÉNEZ-BERNAL, R. E.; BEGNINI, J.; SOUZA, D. O.; DE MELLO, C. F. GMP reverses the facilitatory effect of glutamate on inhibitory avoidance task in rats. **NeuroReport**. v.7, p.2078-2080, 1996.
- RUBIN, M.A.; JURACH. A.; ZANOLLA, G.R.; BOENO, R.; SOUZA, D. O.; MELLO, C.F. Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. **NeuroReport**. v.8, p.3713-2316, 1997.
- RUDOLPHI, K. A.; SCHUBERT, P.; PARKINSON, F.; FREDHOLM, B. B. Adenosine and brain ischemia. **Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.** v.4, p.346-369, 1992.
- SAPOLSKY, R. M. Cellular defences against excitotoxic insults. **J. Neurochem** v.76, p.601-1611, 2001.
- SASTRY, P.S. & RAO, K.S. Apoptosis and the nervous system. **J. Neurochem** v.74, p.1-20, 2000.
- SATOH, T.; NUMAKAWA, T.; ABIRU, Y.; YAMAGATA, T.; ISHIKAVA, Y.; ENOKIDO, Y.; HATANA. H. Production of reactive oxygen species and release of L-glutamate during superoxide anion-induced cell death of cerebellar granule cells. **J. Neurochem** v.70, p. 316-324, 1998.
- SCHMIDT, P. A.; LARA D. R.; MARASCHIN, J. F., PERLA, S. A.; SOUZA O. D. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. **Brain Res.** v.864, p.40-43, 2000.

- SCHRIER, S.M.; FLOREA, B.I.; MULDER, G.J.; NAGALKERKE, J.F.; IJZERMAN, A.P. Apoptosis induced by extracellular ATP in the mouse neuroblastoma cell line N1E-115: studies on the involvement of P2 receptors and adenosine. **Biochem. Pharmacol.** v.63, p. 1119-1126, 2002.
- SCHUBERT, P.; RUDOLPHI, K. A.; FREDHOLM, B.B.; NAKAMURA, Y. Modulation of nerve and glial function by adenosine-Role in the development of ischemic damage. **Int. J. Biochem.** v.26, p.1227-1236, 1994.
- SEGOVIA, G.; PORRAS A.; ARCO D. A.; MORA F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. **Mech. Ageing Develop.** v.122, p.1-29, 2001.
- SHEARDOWN, M. J.; NIELSEN, E. O.; HANSEN, A. J.; JACOBSEN, P.; HONORÉ, T. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. **Science.** v.247, p.571-574, 1990.
- SOUZA, D. O.; & RAMÍREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. **J. Mol. Neurosci.** v.3, p.39-45, 1991.
- STONE, T.W. & ADDAE, J.I. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. **European J. Pharmacol.** 447: 285-296, 2002.
- SWEATT, J.D. The neuronal MAPK kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. **J. Neurochem.** v.23, p.1-10, 2001.
- TASCA, C. I.; & SOUZA, D. O. Interaction of adenosine and guanine derivatives in the rat hippocampus: effects on cAMP levels and on the binding of adenosine analogues and GMP. **Neurochem. Res.** v.25, p.181-188, 2000.
- TASCA, C. I.; WOFCHUK, S. T.; SOUZA, D. O.; RAMÍREZ, G.; RODNIGHT, R. Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate. **NeuroReport** v.6, p.249-252, 1995
- TASCA, C. I.; CARDOSO, L. F.; MARTINI, L. H.; RAMÍREZ, G.; SOUZA, D. O. Guanine nucleotides inhibit cAMP accumulation induced by metabotropic glutamate receptors activation. **Neurochem. Res.** v.23, p.183-188, 1998.
- TASCA, C.I.; BURGOS, J.S.; BARAT, A.; SOUZA, D.O.; RAMÍREZ, G. Chick kainate binding protein lacks GTPase activity. **NeuroReport.** v.10, p.1981-1983, 1999a.
- TASCA, C. I.; CARDOSO, L. F.; MARTINI, L. H.; SOUZA, D. O. Effects of guanine nucleotides on adenosine and glutamate modulation of cAMP levels in optic tectum slices from chicks. **Neurochem. Int.** v.34, p.213-220, 1999b.
- TATHAM, P. E. R.; & LINDAU, M. ATP induces cell permeabilization in rat mastocytes. **J. Gen. Physiol.** v.95, p.459-476, 1991.

- THOMAS, C.E. & MAYLE, D.A. NMDA-sensitive neurons profoundly influence delayed staurosporine-induced apoptosis in rat mixed cortical neuronal cultures. **Brain Res.** v. 889, p.163-173, 2000.
- TRAVERSA U.; BOMBU, G.; DI IORIO, P.; CICCARELLI, R.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.P. Specific [3 H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. **Brit. J. Pharmacol.** v.135, p.969-976, 2002.
- TRAVERSE, S., GOMEZ, H.; PATERSON, C.J.; MARSHALL, P.; COHEN, P. Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparisons of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. **Biochem. J.** v.288, p.351-355, 1992.
- VALLANO, M. L. Developmental aspects of NMDA receptor function. **Crit. Rev. Neurobiol.** v.12, p.177-204, 1998.
- WHITAKER, J.F. Lactate dehydrogenase as a cytoplasmatic marker in brain. **Clin. Chim. Acta** v.24, p.23-27, 1969.
- YANG G.-M. & PAUL, S.M. Cultured cerebellar granule neurons as a model of neuronal apoptosis. In: **Neuromethods** (J. Poirier Ed), Humana Press Inc.v.29, p.47-66, 1997.
- ZIMMERMANN, H. Signalling via ATP in the nervous system. **TINS.** V.17, p.420-426, 1994.